

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica



TESIS DOCTORAL

**Interacciones a nivel de proteinopexia de quinidina y L-
propranolol con una serie de tetraciclinas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Soledad Santillán Fernández

Madrid, 2015

María Soledad Santillán Fernández

TP
1982
132



X-53-044197-6

INTERACCIONES A NIVEL DE PROTEINOPEXIA DE QUINIDINA
Y L-PROPRANOLOL CON UNA SERIE DE TETRACICLINAS

Departamento de Química Orgánica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense de Madrid
1982



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 132/82

© María Soledad Santillán Fernández
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-16197-1982

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

"INTERACCIONES A NIVEL DE PROTEINOPEXIA DE QUINIDINA Y L-PROPRANOLOL CON UNA SERIE DE TETRACICLINAS"

Memoria presentada por:

MARIA SOLEDAD SANTILLAN FERNANDEZ

para aspirar a la obtención del
grado de Doctor en Ciencias Químicas

JUNIO, 1981

DPTO. COORDINADO DE FARMACOLOGIA
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
—
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DTOR.: PROF. P. D. GARCIA DE JALON

FACULTAD DE MEDICINA
PABELLON 3
CIUDAD UNIVERSITARIA
MADRID-3
TELEFOS. 243 76 85 - 449 34 33

PERFECTO GARCIA DE JALON HUETO, CATEDRATICO DIRECTOR
DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA, DE LA FACULTAD DE
MEDICINA, DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA:

Que la Srta. MARIA SOLEDAD SANTILLAN FERNANDEZ, ha realizado bajo nuestra dirección y tutela el presente trabajo que lleva por título: "INTERACCIONES A NIVEL DE PROTEINOPEXIA DE QUINIDINA Y L-PROPRANOLOL CON UNA SERIE DE TETRACICLINAS" para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas, y que se encuentra ya concluido, por lo cual autorizo su presentación a fin de ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmo el presente en Madrid a nueve de Junio de mil novecientos ochenta y uno.



A mis padres

Deseo expresar mi agradecimiento:

Al Prof.Dr.D. Rafael Perez Alvarez-Osorio, Catedrático-Director del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, por su ayuda recibida y por aceptar ser Ponente del presente trabajo.

Al Prof.Dr.D. Perfecto Garcia de Jalón Huetó, Catedrático-Director del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, de la Universidad Complutense de Madrid, por la dirección, acogida, constante apoyo y enseñanzas recibidas a lo largo de esta investigación sin cuya ayuda no hubiera sido posible su realización.

A la Dra. María Rosa Martínez Larrañaga, Colaborador Científico del C.S.I.C. del Departamento Coordinado de Farmacología y Toxicología, por su ejemplo de calidad científica, espíritu universitario, valores humanos y por su gran cooperación y ayuda a lo largo de todo este trabajo y sin lo cual no hubiera sido posible el mismo.

A Dña. María Elena Vicente, Secretaria del Departamento de Farmacología, de la Facultad de Medicina, de la Universidad Complutense de Madrid, por su considerable ayuda en la escritura y presentación de este trabajo.

A toda la gran familia que es este Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, de la Universidad Complutense de Madrid, por su colaboración y empuje de animo que me han proporcionado en todo momento.

I N D I C E

Pag.

1. Introduccion

1.1. Consideraciones sobre la Farmaco-proteinopexia	1
1.1.1. Desplazamiento e interacción de fármacos	3
1.1.2. Aspectos fisico-químicos de la interacción fármaco-proteína	5
1.1.3. Consecuencias Farmacocinéticas de la unión	9
1.1.4. Fármaco-Proteinopexia y procesos patológicos	14
1.2. Proteinopexia plasmática de la quinidina y del 1-propranolol	19
1.2.1. Quinidina	19
1.2.2. Propranolol	26
1.3. Proteinopexia plasmática de Tetraciclinas	32
1.4. Justificación del tema elegido	42

2. Material y Métodos

2.1. Método general para el estudio de la fármaco- proteinopexia	47
2.2. Determinación de la proteinopexia por ultrafil- tración	48

2.3. Determinación de la proteinopexia por precipi-	
tación con ClO_4H	56
2.4. Determinaciones analíticas.....	57
2.4.1. Determinación analítica de la quinidina.....	57
2.4.2. Determinación analítica de la clortetraciclina ..	63
2.4.3. Determinación analítica de la demetilclortetra-	
ciclina	66
2.4.4. Determinación analítica de la minociclina	69
2.4.5. Determinación analítica de la oxitetraciclina ...	72
2.4.6. Determinación analítica de la tetraciclina	75
2.5. Determinación analítica del 1-propranolol- ^3H	78
2.5.1. Conservación de la actividad optica del pro-	
pranolol después del marcaje isotópico	78
2.5.2. Determinación de la purificación del 1-pro-	
pranolol- ^3H de las posibles sustancias de radio-	
lisis	79
2.5.3. Determinación radiométrica del 1-propranolol- ^3H .	80
2.6. Determinación analítica en los estudios de inte-	
racción farmaco-proteinopexia	81
2.7. Fármacos y reactivos utilizados	83

3. Resultados

3.1. Unión de la quinidina a la seroalbúmina bovina por ultrafiltración	87
3.2. Unión de una serie de Tetraciclinas a la seroal- búmina bovina por ultrafiltración	93
3.3. Interacción de la quinidina sobre la unión de una serie de Tetraciclinas a la seroalbúmina bo- vina por ultrafiltración	120
3.4. Interacción de una serie de Tetraciclinas sobre la unión de la quinidina a la seroalbúmina bovi- na por ultrafiltración.....	133
3.5. Unión del 1-propranolol- ³ H a la seroalbúmina bo- vina	146
3.6. Interacción del 1-propranolol- ³ H sobre la unión de una serie de Tetraciclinas a la seroalbúmina bovina	152
3.7. Interacción de una serie de Tetraciclinas sobre la unión del 1-propranolol- ³ H a la seroalbúmina bovina	171

4. <u>Discussion</u>	195
5. <u>Conclusiones</u>	209
6. <u>Bibliografia</u>	219

INTRODUCCION

1.1. Consideraciones sobre la Fármaco-Proteinopexia.

Existen muchas razones para estudiar los mecanismos de la interacción fármaco-proteína. Podemos indicar que estudios sobre las interacciones de los fármacos a diversos niveles como en receptores, neuronas, sistemas de transporte, membranas y enzimas han servido para clarificar los mecanismos de por qué los fármacos ejercen sus efectos farmacológicos y terapéuticos.

La mayor parte de los fármacos, ejercen su efecto farmacológico a través de una interacción con cierta proteína en el organismo, y se eliminan del mismo principalmente por un sistema de transporte o bien por metabolitos vía enzimática.

Ahora bien, la unión de los fármacos a lugares no activos tales como proteínas séricas e hísticas, también tienen indicaciones farmacológicas importantes porque tales interacciones frecuentemente determinan la velocidad con la que el fármaco se absorbe del tracto gastrointestinal, se transporta a diversos tejidos y se elimina del organismo, aunque en estas fases farmacocinéticas debemos tener en cuenta que la distribución de los fármacos depende no solamente de su interacción con las proteínas sino también de la interacción con otros factores.

Por la amplia diversidad de las características físico-químicas de los fármacos y por la amplia variedad de los mecanismos que pueden afectar la distribución orgánica de los fármacos, no es sorprendente que la localización relativa de los fármacos entre los tejidos y el plasma pueda diferir significativamente de un fármaco a otro. Tampoco sería sorprendente encontrar que la concentración de un fármaco no copulado sea considerablemente menor

que el nivel total plasmático o el nivel total hístico de dicho fármaco. En efecto, la determinación de los niveles relativos entre el plasma y diversos tejidos frecuentemente da una impresión errónea del fenómeno de unión porque estos fenómenos generalmente se enlazan a diversos componentes hísticos tanto como en el plasma. Por otro lado, un fármaco puede ser altamente unido a proteínas plasmáticas aun cuando la relación entre los niveles hísticos y plasmáticos sean altos. Por ejemplo, se sabe que a los 90 minutos de la administración intravenosa de imipramina (20 mg/Kg) en conejos, los niveles del fármaco fueron aproximadamente 12 $\mu\text{g/ml}$ en cerebro y 0,6 $\mu\text{g/ml}$ en plasma. Sin embargo, al menos un 97% de imipramina en cerebro y un 82% del fármaco en plasma estaban unidos a proteínas, por lo tanto, esto indica que las concentraciones de imipramina no copuladas en estos tejidos eran menores que 0,15 $\mu\text{g/ml}$. (1).

La unión de fármacos a proteínas hísticas en órganos extravasculares decrece su concentración en sangre y por lo tanto retarda su eliminación por riñón, hígado o pulmón. Sin embargo, la unión de fármacos a proteínas plasmáticas puede bien adelantar o retardar su eliminación dependiendo del mecanismo de excreción. Por ejemplo, la unión de fármacos a proteínas plasmáticas disminuye las concentraciones del fármaco libre en sangre y por lo tanto disminuye su velocidad de eliminación por filtración glomerular y por sistema de transporte no eficientes en el riñón. Además, la unión de fármacos a proteínas plasmáticas puede disminuir la velocidad de eliminación de fármacos solubles en lípidos que difunden rápidamente del filtrado glomerular volviendo a sangre aunque estos fármacos se transporten rápidamente por sistemas de transporte activo. Igualmente, la unión de fármacos a proteínas plasmáticas

puede también disminuir el índice de metabolismo del fármaco por sistemas enzimáticos en hígado relativamente inactivos, en especial cuando la K_m del enzima es alta.

1.1.1. Desplazamiento e interacción de fármacos.

Se demostró que la fenilbutazona desplaza a ciertas sulfonamidas de la seroalbúmina y por lo tanto aumenta la acción antibacteriana de estos compuestos aunque sus niveles plasmáticos totales disminuyan (2).

Estudios "in vitro" han revelado un gran número de complejidades con esta clase de interacción de fármacos. No todos los fármacos aniónicos altamente copulados pueden desplazar a otro de la seroalbúmina. Por ejemplo: el campototecin puede ser desplazado de la seroalbúmina por la fenilbutazona pero no por el dicumarol, aunque los tres fármacos están altamente copulados a la seroalbúmina. Similarmente, la indometacina puede ser desplazada de la albúmina sérica por el ácido salicílico pero no por la fenilbutazona o por el probenecid (3). Un fármaco puede estar unido a diversos sitios en la molécula de la albúmina sérica, por lo tanto, parece probable que una sustancia podría ser capaz de desplazar a un fármaco de alguno de sus sitios de unión pero no de otros, porque dos sustancias podrían desplazar a un fármaco de la albúmina sérica aunque cada sustancia no pueda desplazar a la otra de sus lugares separadamente.

En Farmacología se debe tener en cuenta los estudios de unión de fármaco-proteínas "in vitro" e "in vivo" y que los fármacos pueden estar copulados además de a la albúmina sérica a otras proteínas plasmáticas. Algunas proteínas plasmáticas, tienen una alta afinidad a ciertas hormonas endógenas como la corticosterona, testosterona, estrógenos y tiroxina y ellas pueden actuar como transportadores especializados en sangre. Por lo tanto, sustancias analogas a estas hormonas pueden también estar copuladas en cierto grado por estas proteínas. Además, diferencias individuales en la unión de fármacos a proteínas pueden originarse cuando el fármaco provoca la formación de anticuerpos en la fracción gamma-globulina.

También se debe tener en cuenta que muchas sustancias en sangre están enlazadas a proteínas séricas y por lo tanto aceptarían la unión de fármacos. Por ejemplo: los ácidos grasos se conoce que afectan la unión de la fenilbutazona y warfarina a la albúmina sérica (4), y la bilirrubina afecta la unión de ciertas sulfonamidas como el sulfafenzol (5). Actualmente, parece común que muchas de las diferencias aparentes encontradas en la unión de fármacos a proteínas plasmáticas de animales neonatales y adultos no es debido a las diferencias en la albúmina sino a las altas concentraciones no usuales de bilirrubina y de otras sustancias endógenas presentes en la sangre de animales neonatales. De la misma forma se piensa en la posibilidad de que la unión de fármacos a proteínas plasmáticas puede estar alterada marcadamente en pacientes con alteraciones en donde los niveles de proteínas plasmáticas enlazadas a

sustancias endógenas está fuertemente alterados.

En resumen, podríamos decir que la unión de los fármacos a los componentes hísticos y sanguíneos como proteínas puede profundamente influenciar no solo las acciones farmacodinámicas y toxicológicas del fármaco, sino también su disposición orgánica. Los estudios "in vitro" de la unión de fármacos a la albúmina plasmática pueden suministrar una información de valor sobre la naturaleza y el número de puntos de unión en las moléculas protéicas. Además es importante considerar situaciones donde otros compuestos presentes en sangre pueden competir con fármacos en sus lugares de unión y por lo tanto puede alterar las constantes de afinidad aparentes de los complejos fármaco-proteína. Por ello, sería necesario tener en cuenta si las diferencias individuales encontradas en la unión de fármacos a proteínas se debe a las diferentes concentraciones de las proteínas, a proteínas modificadas, o a la presencia de sustancias desplazantes. La falta de información sobre las constantes de asociación de los complejos fármaco-proteína y de la concentración del fármaco no copulado o libre pueden marcadamente afectar la validez de los estudios farmacocinéticos sobre la biodisponibilidad y metabolismo de los fármacos que dirigen la pauta de dosificación.

1.1.2. Aspectos fisico-químicos de la interacción fármaco-proteína.

La unión fármaco-proteína en esencia es una interacción entre una pequeña molécula y una macromolécula biológica. Este tipo de complejo es solamente uno de las muchas clases

de interacción protéica en donde en general constan de dos tipos fundamentales intramolecular e intermolecular.

En una visión general la unión de molécula pequeña-proteína podría cubrir los aspectos siguientes de interacciones como:

- 1) Estequiométrica.
- 2) Energética.
- 3) De naturaleza molecular.
- 4) Dinámica.
- 5) Función biológica.

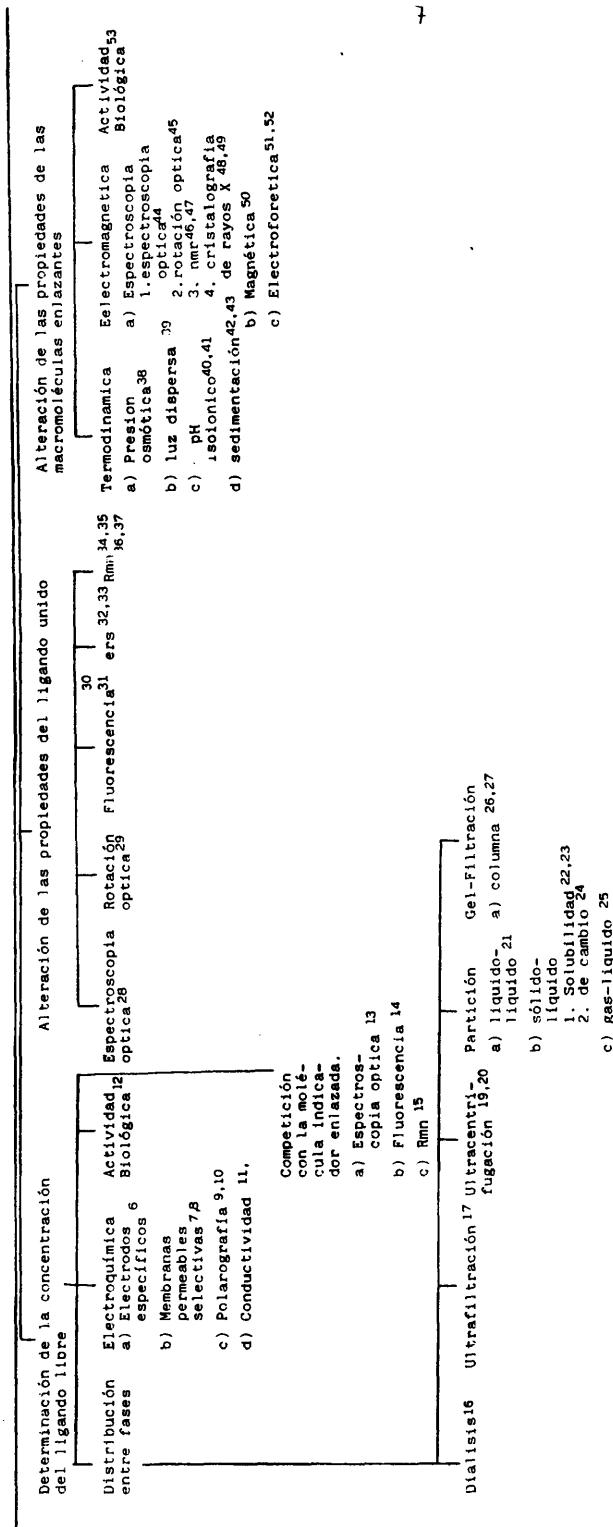
estudios todos ellos que ilustrarían algunos de los principios generales que gobiernan las interacciones minimolécula-macromolécula.

Se han desarrollado numerosos métodos físicos-químicos para estudiar la unión de un pequeño ligando con las proteínas. La Tabla I que se expresa a continuación recoge los diversos métodos reportados en la literatura. Cada una de estas técnicas depende de los siguientes procedimientos:

- a) Determinación de la concentración de los ligandos no copulados o libres.
- b) Detección de una alteración en una propiedad fisico-química del ligando copulado.
- c) Detección de una alteración en una propiedad fisico-química de la proteína enlazante.

De todos los métodos indicados en la Tabla adjunta podemos considerar que los métodos clásicos más utilizados para estimar el grado de unión de fármacos a proteínas son diálisis, ultrafiltración y filtración por gel. Estos mé-

MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA UNIÓN DE PEQUEÑOS LIGANDOS CON MACROMOLECULAS



todos clásicos implican como principio básico fundamental la separación física de una relativamente pequeña molécula del fármaco libre de grandes partículas de proteína y del complejo fármaco-proteína. En esta separación va implicada el uso de una barrera o membrana con un tamaño de porosidad suficiente para permitir el paso de pequeñas moléculas pero no el paso de las grandes moléculas de proteína o las del complejo fármaco-proteína.

La evaluación de la concentración del fármaco libre se viene realizando comunmente por uno o por varios de estos tres procedimientos. En los últimos años los procedimientos de ultrafiltración y de filtración por gel se vienen recomendando por sus buenos resultados. Las principales ventajas de la utilización del método de ultrafiltración para estudios de unión de fármacos a proteínas son una economía en el tiempo con un material relativamente similar al requerido para la diálisis de equilibrio. La ultrafiltración se ha realizado en un gran número de estudios recientes sobre la interacción fármaco-proteína. Por este método se obtienen datos análogos (54) a los obtenidos por el método de diálisis (55). De la misma forma, se estudia (56) la unión del salicilato a proteínas plasmáticas obteniéndose resultados comparables con diálisis de equilibrio. En este trabajo se ha elegido el método analítico de ultrafiltración ya que este procedimiento parece reportar estudios cuantitativos óptimos de competición entre fármacos y su unión a proteínas, problema importante a tener en cuenta en el campo de la Farmacología.

1.1.3. Consecuencias farmacocinéticas de la unión.

Las propiedades de muchos fármacos en Terapéutica se han considerado en la literatura en términos de sus propiedades de unión a proteínas plasmáticas. Existen numerosos estudios sobre antibióticos tales como penicilinas, sulfamidas, anti-coagulantes, antiinflamatorios no esteroideos como la fenil-butazona y agentes quimioterápicos del cancer entre otros. De la misma forma ciertas hormonas endógenas como la tiroxina se unen altamente a proteínas específicas y esta unión puede jugar un papel importante en la regulación de los niveles de estos agentes en sus receptores. Se atribuyen las diferencias encontradas entre distintas especies animales a la respuesta de un fármaco en quimioterapia de combinación y este hecho ha sido interpretado como un resultado del desplazamiento del fármaco de sus lugares de unión en las proteínas plasmáticas (57).

Igualmente, es común aceptar que la unión de fármacos a los constituyentes plasmáticos influyen en la Farmacodinámica de estas sustancias. Las implicaciones cuantitativas de la unión a proteínas en Farmacocinética se viene evaluando por medio de una metodología analítica de modelos uni ó multicompartimentales. La unión de fármacos a proteínas plasmáticas puede originar una no-linearidad detectable en las gráficas de logaritmo de la concentración frente al tiempo unicamente si las dosis son lo suficientemente altas para alcanzar una saturación de los lugares de unión y existe una eliminación negligible del fármaco copulado. No obstante, en ciertos casos la unión de un fármaco a proteínas

puede tener consecuencias limitadas si se compara con otros parámetros en el campo de la Farmacocinética de interacciones de fármacos.

La unión de fármacos a proteínas es un conocimiento básico a tener en cuenta en Farmacología Clínica, ya que es una propiedad físico-química que influye significativamente en la distribución y eliminación de un fármaco en el organismo.

Los factores que pueden influenciar la unión de un fármaco bajo condiciones clínicas esquemáticamente son:

- a) Alteraciones relacionadas con la edad y diferencias individuales.
- b) Efecto del pH sobre la eliminación y distribución de los fármacos y la concentración de albúmina (una determinada enfermedad puede marcadamente influenciar la concentración del fármaco libre por alteración del pH, por la concentración de la albúmina y por la naturaleza de la proteína).
- c) Modificación de la unión de un fármaco por otros agentes (la unión de un fármaco puede estar disminuida o incrementada por otro fármaco ó por un sustrato normal fisiológico).
- d) Desplazamiento: a priori la unión de un fármaco a las proteínas plasmáticas (e hísticas), puede ser disminuida competitivamente por otras sustancias dependiendo de las concentraciones y de las afinidades de los lugares implicados (Fig. A y B). Un fármaco puede ser desplazado por un propio metabolito o metabolitos ó por un metabolito de otro fármaco. En muchos casos el despla-

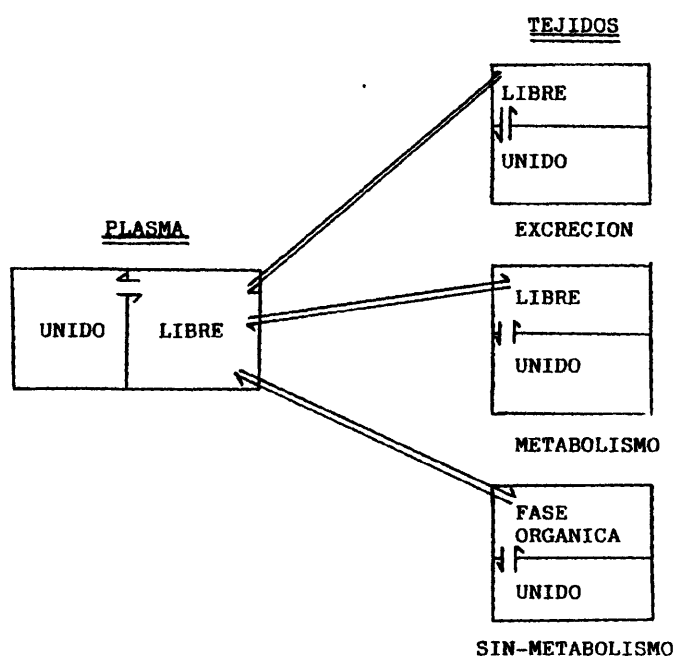


Fig. A .- Transporte del fármaco libre desde plasma a los tejidos. La alteración en la unión a proteínas plasmáticas puede afectar los procesos de transferencia.

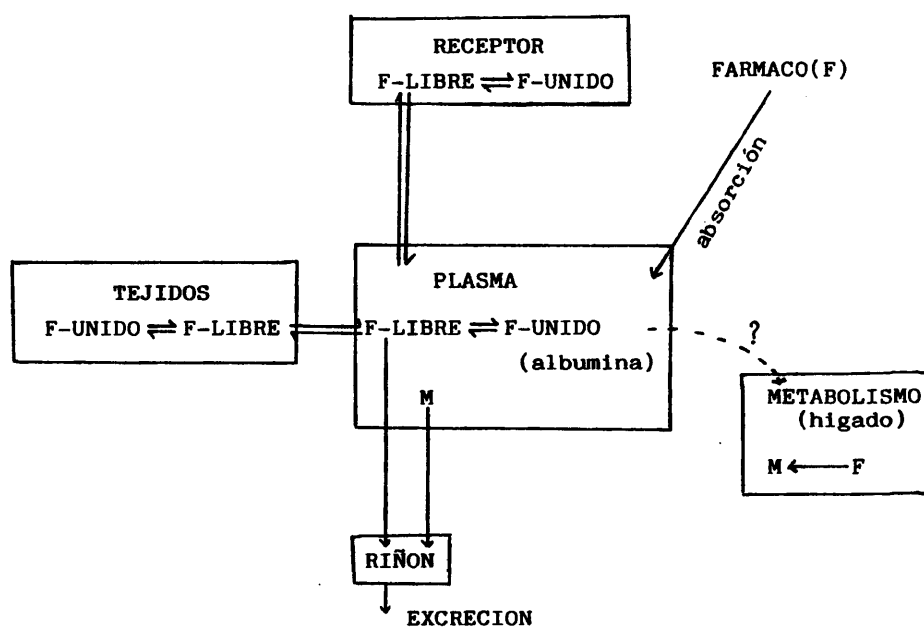


Fig. B .- Representación esquemática de la distribución de fármacos en los diferentes compartimientos.

miento aumenta el efecto terapéutico de un fármaco y puede llegar a originar una toxicidad. Frecuentemente el desplazamiento no es el único fenómeno que ocurre, por ejemplo: se conoce que el probenecid origina una disminución en el volumen de distribución, bloquea la secreción tubular, decrece la eliminación e incrementa el metabolismo de penicilinas en el hombre (58). De la misma forma, se ha encontrado que la sulfinpirazona y salicilatos compiten con el transporte renal y en la unión con proteínas plasmáticas (59).

- e) Potenciación: muy pocos fármacos potencian la unión de otros fármacos a las proteínas plasmáticas (60,61). Sin embargo, es interesante señalar que los ácidos grasos pueden competir con los lugares de unión con diversos fármacos (62,64), pero pueden también, originar alteraciones conformacionales incrementando el número de puntos de unión. Algunas de estas alteraciones solamente se han estudiado en animales "in vitro" y su significancia clínica no está del todo elucidada (64,65).
- f) Unión a globulinas y otras proteínas: la interacción de los fármacos con proteínas diferentes de la albúmina como las globulinas es otro punto de interés. Diversos compuestos (especialmente aquellos que son muy pocos solubles en agua o aquellos que contienen metales pesados) se unen específicamente a globulinas (66). De la misma forma es importante la información de las interacciones de fármacos con las membranas celulares, glóbulos rojos, plaquetas, leucocitos, etc...

g) Diferencias de especies en la unión a proteínas: la unión de fármacos en diversas especies animales no es taxativamente predecible. Sin embargo, si la estructura de la albúmina (no solo la composición de aminoácidos) se conoce, puede ser posible hacer extrapolación de unas especies animales a otras (67,68).

Ante el problema de los numerosos factores que pueden influir en la unión de un fármaco a proteínas en síntesis podríamos indicar que la significancia clínica de la unión fármaco-proteína debe ser siempre condicionada a realizar estudios en condiciones fisiológicas, es decir, midiendo la unión a proteínas específicas (albúmina o globulinas) a 37°C (pH = 7,4) con concentraciones del fármaco dentro de un rango terapéutico.

1.1.4. Fármaco-Proteinopexia y procesos patológicos.

Muchos autores han discutido la influencia de diversos estados patológicos sobre la unión de fármacos a proteínas plasmáticas y las consecuencias farmacocinéticas, farmacológicas y terapéuticas derivadas. Entre las numerosas enfermedades que afectan la disposición de fármacos y mas concretamente que originan alteraciones en la unión de estos a proteínas podríamos incluir alteraciones renales crónicas (69), alteraciones hepáticas (70), y nefrosis (71).

Los mecanismos fisiopatológicos que modifican la unión de fármacos a proteínas plasmáticas como fenómeno principal hay que destacar aquellos que originan concretamente

una disminución de la unión del fármaco a proteínas.

Las principales modificaciones implicadas en las proteínas plasmáticas se pueden cifrar en:

1) Hipoalbuminemia: la hipoalbuminemia se caracteriza, como su nombre indica, por una disminución en la concentración de albúmina en plasma. Ya que la unión de un fármaco depende de la cantidad de proteína enlazante disponible, cuando ésta disminuye también decrecerá la cantidad de fármaco unido e incrementará por tanto la forma libre que es la farmacológicamente activa. Clínicamente esto originaría una respuesta aumentada o puede quizás llegar a desarrollar una toxicidad. Igualmente, bajo un estado de hipoalbuminemia, cuando se administran conjuntamente dos fármacos puede originarse una potenciación mutua de sus efectos farmacológicos y toxicológicos.

2) Modificaciones de los compartimientos orgánicos: Las modificaciones en los compartimientos orgánicos, principalmente en plasma y en el fluido intersticial donde debe existir un equilibrio dinámico entre ellos, pueden surgir por mecanismos secuestrantes de proteínas plasmáticas en diversos estados patológicos. Desde el punto de vista farmacológico, la pérdida de albúmina del compartimiento plasmático originará un descenso en la concentración plasmática y en el fármaco unido.

3) Disminución de la afinidad a la albúmina: en fallos renales crónicos existe un descenso de la unión del fármaco a proteínas, particularmente puede existir por una hipoal-

buminemia y por la presencia de inhibidores endógenos de la unión. Una posible explicación sería la modificación de la estructura molecular de la albúmina de manera que se produce un descenso en la afinidad del fármaco.

Las enfermedades asociadas con la disminución de la unión de un fármaco a las proteínas plasmáticas podríamos expresarlas esquemáticamente en el siguiente cuadro:

PRINCIPALES MECANISMOS QUE INLUYEN EN LA DISMINUCIÓN DE LA UNION DE UN FARAMCO A PROTEINAS
EN CIERTOS ESTADOS PATOLOGICOS (72)

	ALTERACIONES HEPATICAS	FALLO RENAL CRONICO	NEFROSIS	MALNU- TRICION	FALLO CARDIACO
MECANISMOS DE HIPOALBUMINEMIA					
Descenso urinario		+	+		
Pérdida del fluido intersticial	+	+	+	+	+
Disminución de la síntesis en hígado	+	+		+	+
Captación insuficiente de proteína		+		+	+
MECANISMOS DE AFINIDAD APARENTE DISMINUIDA DE LA ALBUMINA					
Alteraciones estructurales de la albúmina	+	+			
Inhibidores endógenos de la unión	+	+			
Ácidos grasos libres		+	+	+	+
Acidosis metabólica		+		+	+

A la vista de las múltiples implicaciones que pueden originarse en la práctica clínica por los diversos estados patológicos que pueden presentarse sería interesante en el campo de la Farmacología Clínica realizar previamente a cualquier tratamiento en un paciente una determinación "in vitro" en el plasma propio del paciente, estudiando el grado de unión de la dosis del fármaco que posteriormente le será administrado en su tratamiento terapéutico. Con esta metodología podríamos estudiar la dosis óptima, más aún, ya que es factible tener en cuenta los posibles inhibidores endógenos presentes en el individuo.

1.2. Proteinopexia plasmática de la quinidina y del l-propranolol.

1.2.1. Quinidina.

La medida de los niveles plasmáticos de un fármaco es un factor importante a tener en cuenta para establecer y seleccionar la dosis terapéutica (73) y estos niveles plasmáticos deben ser interpretados en conjunto con los estimados de la unión del fármaco a proteínas plasmáticas. Estos estudios se vienen utilizando correctamente con el fin de determinar la concentración activa farmacológica del fármaco libre en plasma y también para calcular los diversos parámetros cinéticos como la constante de eliminación y el volumen de distribución, parámetros íntimamente relacionados con la unión del fármaco a proteínas plasmáticas.

La unión de un fármaco a proteínas plasmáticas puede afectar específicamente a su distribución, eliminación y efectos farmacodinámicos. Para predecir posibles alteraciones en la unión a proteínas de un fármaco específico en suero de un paciente individual, se deberían conocer las diferentes fracciones integrantes de proteínas en plasma de dicho paciente para poder establecer las variaciones en las proteínas totales del suero. Mientras que la albúmina es la proteína dominante y enlazante de un fármaco en el suero, las otras proteínas séricas pueden estar a menudo sujetas a mayores alteraciones que la albúmina. Consecuentemente, si proteínas distintas que la albúmina pueden contribuir a provocar más frecuentes variaciones en la unión de fármacos es interesante realizar estudios sobre unión a

proteínas basandose en experimentos con suero total con concentraciones normales o más bajas de albúmina, además de con preparaciones de albúmina sérica unicamente.

La quinidina, uno de los compuestos elegidos para este trabajo, se ha descrito como un fármaco antiaritmico con capacidad de deprimir el automatismo, excitabilidad y velocidad de conducción y de prolongar el periodo refractario, acciones que se atribuyen a una actividad depresora directa sobre la corriente de sodio y respuestas de membrana en fibra cardíaca.

La Farmacocinética de la quinidina se ha estudiado en diversas especies animales y concretamente por ejemplo en perros la quinidina por vía i.v. se ajusta a un modelo cinético monocompartmental con un semiperiodo biológico ($t_{1/2}$) en plasma de unas 6 horas (74). En el caso del hombre es bicompartimental y el $t_{\beta 1/2}$ (fase lenta de disposición) en plasma tras dosis orales, también es de unas 6 horas en pacientes con función renal normal (75,76). Al menos la mitad de la dosis administrada se metaboliza en hígado y los metabolitos se eliminan por vía urinaria (77,78), recuperándose de forma inalterada en orina de un 10 a un 50% en unas 24 horas (76). En pacientes con fallo cardíaco ó insuficiencia renal se ha observado que el $t_{1/2}$ en plasma se prolonga (76,79), aunque otros autores no observan una alteración de la eliminación de quinidina en pacientes con fallo cardíaco o con insuficiencia renal (80).

La biodisponibilidad de la quinidina en forma de sulfato por vía oral en el hombre es de un 70% (81), resultado com-

parable al encontrado previamente para el gluconato de quinidina en el que señalan una biodisponibilidad de un 72% (82). El rango terapéutico seleccionado para la quinidina ha sido de 1-4 $\mu\text{g/ml}$ (83,84).

Se conoce que la interacción de la quinidina con diversas proteínas son procesos fundamentales a través de los cuales la quinidina puede ejercer numerosos efectos. Por ejemplo, la quinidina se une con lipoproteínas de la membrana pudiendo originar un descenso en la permeabilidad de la membrana y en el movimiento iónico pasivo. Esta alteración de la permeabilidad es responsable de las alteraciones inducidas por la quinidina en el intercambio sodio-potasio en fibra cardíaca. La unión de la quinidina con proteínas enzimáticas específicas puede ser responsable de alteraciones en el metabolismo intermediario adscritas a la quinidina. La actividad de la glucosa 6-fosfato dehidrogenasa se reduce "in vitro" por la quinidina. La unión de la quinidina a la albúmina puede proteger a la célula frente a la acción de la quinidina por provocar menos fármaco útil o libre en los lugares celulares de acción. La albúmina se puede considerar realmente una proteína modelo de estudio muy útil por estar presente en cantidades adecuadas y en relativa pureza. La interacción quinidina-albúmina puede ser considerada como un prototipo de forma "protectora" y quizás como una característica de todas las formas de unión de la quinidina a proteínas. Se han realizado investigaciones sobre la unión a la albúmina de la quinidina y otros compuestos relacionados. Estos experimentos han permitido

estudiar la estequiometría, constantes de asociación y energía de enlace para las interacciones, y observar las contribuciones a la unión por diversos sitios o áreas receptoras ó de reacción en la molécula de la quinidina.

Así se estudia la unión de la quinidina a la albúmina "in vitro" por un sistema de diálisis de equilibrio observando que la quinidina se une a la albúmina sérica humana en un 80%, siendo la unión a la gamma globulina negligible (85). Además, realizaron similares investigaciones con compuestos relacionados como el 4-hidroxi-metil-6-metoxi-quinolina; 6-metoxi-quinolina; 4-hidroxi-metil-quinolina; quinolina y naftaleno. Evalúan los posibles efectos inhibitorios del naftaleno sobre la unión quinidina-albúmina así como los efectos del alcohol benzílico y de la trietil-diamina. La interacción de compuestos tipo quinolina relacionados con la quinidina, con la albúmina se caracteriza por un incremento en el número de sitios de unión en la albúmina y una disminución de las constantes de asociación cuando los sitios activos químicamente en la molécula quinolina son eliminados. Todos los fármacos tipo quinolina testificados parecen competir con la quinidina probablemente en un área receptora común. Según estos investigadores, la unión de la quinidina a la albúmina parece depender de la interacción proteica con el anillo quinolina básico y más o menos en la interacción con el nitrógeno quinolina, el metoxi y los grupos hidroxil secundarios. Los últimos tres grupos, probablemente, interaccionan con los sitios de unión de la proteína formando un puente de hidrógeno.

Como consecuencia de estos estudios, se ha sugerido que esta clase de interacción fármaco-proteína que puede estar implicado a nivel de membrana, músculo, ó a nivel de una proteína específica enzimática puede ser fundamental para originarse la acción de la quinidina sobre el miocardio y el sistema vascular. Basándose en estos resultados sobre la unión quinidina-albúmina, se estudia cómo influyen diversas iones sobre la interacción quinidina-albúmina (86). Estudian la influencia del sodio, potasio, hidrógeno, calcio y cloro. Observan que concentraciones apropiadas de hidrógeno calcio y cloro alteran marcadamente la unión quinidina-albúmina. Pero bajo condiciones fisiológicas los efectos del hidrógeno y del calcio fueron de proporciones más modestas y de una incierta importancia clínica; los efectos del cloro parecen inapreciables. Ningún efecto sobre la interacción quinidina-albúmina fuero atribuibles a la influencia de los iones sodio o potasio. De todo ello, se sugiere la posibilidad de que los dos sitios de unión en la molécula de albúmina implicados en la reacción de unión son un grupo imidazol de la fracción de histidina y un grupo hidroxilo posiblemente de un residuo de serina o de tiroxina.

Aunque generalmente se ha señalado que la quinidina principalmente se une a la albúmina en plasma, se observa, que la albúmina no es la única proteína sérica responsable de la unión de la quinidina (87). Fraccionando proteínas séricas por filtración de gel y determinando la unión de la quinidina por equilibrio de diálisis demuestran que la quinidina se une a lipoproteínas y que esta interacción es-

tá gobernada por la ley de acción de masas. La unión a lipoproteínas de baja y alta densidad presenta dos sitios de unión en cada proteína y las constantes de disociación, K , y los números de sitios de unión, n , fueron: para la proteína de baja densidad $K_1 = 2 \cdot 10^{-5}$, $n_1 = 1$ y $K_2 = 5,2 \cdot 10^{-4}$ y $n_2 = 97$, y para la proteína de alta densidad $K_1 = 1,9 \cdot 10^{-5}$, $n_1 = 0,1$ y $K_2 = 1,1 \cdot 10^{-3}$, $n_2 = 14,7$. Estos experimentos, no establecen completamente si la interacción tiene lugar con la parte lipídica o con la parte proteica de las moléculas de lipoproteínas. Hay que considerar también que las lipoproteínas como otras proteínas pueden estar alteradas por los diferentes métodos de separación utilizados cuando se aíslan de otras macromoléculas y por la influencia de una fase acuosa diferente de la del suero.

Se conoce que muchos fármacos básicos están caracterizados por un volumen de distribución grande que a su vez influye en su distribución cinética (88). Tales fármacos a menudo están unidos fuertemente a proteínas plasmáticas y su distribución entre plasma y tejidos se viene explicando por una distribución pH-dependiente y por la unión a proteínas hísticas y plasmáticas (89). La quinidina, tiene un gran volumen de distribución en ratas (90), y en el hombre (91), y se ha demostrado que el volumen de distribución disminuye en ratas con anuria (90) con un incremento en la unión de la quinidina al plasma (92). Bajo estas bases es interesante el estudio de si la quinidina se une a proteínas hísticas como en el corazón y si la unión en el corazón y en el suero puede explicar la distribución observada de este fármaco y el descenso encontrado en la distribución en

ratas con anuria. Así, se estudia la unión de la quinidina en homogeneizado de corazón y en suero de ratas normales y de ratas con anuria (93). Los resultados demuestran que el porcentaje de unión y las constantes de asociación son similares en homogeneizados de corazón de ratas normales y de ratas con anuria, pero más superiores que en el suero, es decir, el estado anúrico induce un aumento de la unión de la quinidina a proteínas séricas, resultado que confirma las observaciones referidas previamente (90,92), y que probablemente se puede explicar principalmente por un incremento en la concentración sérica de la α_1 -ácido glicoproteína (94,95).

1.2.2.- Propranolol.

Los agentes beta-bloqueantes adrenérgicos actualmente se vienen empleando como fármacos efectivos frente a la hipertensión, angina de pecho y diversas formas de arritmias cardíacas. El propranolol es uno de los principales agentes beta-bloqueantes adrenérgicos que tienen un amplio uso clínico en estos procesos patológicos. Se absorbe por vía intestinal, pero debido a su alto efecto de "first-pass" a través del hígado, los niveles sanguíneos alcanzados tras una dosis simple ó tras una dosificación prolongada pueden variar dependiendo de los individuos. El semiperiodo biológico en pacientes hipertensivos es de unas 4-6 horas (96).

El propranolol es un agente beta-bloqueante adrenérgico, no cardiosselectivo con efectos periféricos bronquiales y cardíacos que puede ser utilizado para el tratamiento de una amplia variedad de arritmias atriculares y ventriculares. La preparación farmacológica comercial es una mezcla racémica de los isómeros d y l. Ambos isómeros exhiben propiedades activas de membrana a concentraciones extremadamente altas, pero a dosis efectivas clínicas las propiedades antiarrítmicas están por encima de las propiedades beta-bloqueantes del isómero-l. La farmacocinética del propranolol ha sido muy estudiada aunque no está del todo bien elucidada. Este fármaco posee un semiperiodo biológico de 2,3 horas, tras la administración i.v. y de 3,2 horas tras la administración oral (97). El propranolol se metaboliza en hígado, se excreta por vía renal y únicamente del 1 al

4% de la dosis aparece en heces (98). Al menos ocho metabolitos se han encontrado en la orina, los cuales también se ha observado que poseen efectos cardíacos y tienen toxicidad similar al propranolol (99,100).

Se han descrito resultados comparables sobre la farmacocinética del propranolol señalando que tras la administración i.v. a dosis simple en el hombre, el propranolol en sangre se ajusta a un modelo cinético abierto bicompartimental con un $t_{1/2}$ de 6 minutos y $t_{1/2}$ de 2,5 horas y un volumen de distribución de 200 litros (101). En especies animales como perro, mono y rata, el $t_{1/2}$ en plasma es más corto (40 minutos) (102). En el hombre el 95% de la dosis administrada se metaboliza en hígado y el mayor metabolito encontrado tras la administración oral es el 4-hidroxi-propranolol (98) el cual posee la misma actividad antagonista beta-adrenérgica que el propranolol.

Las diferencias interindividuales que se encuentran en la amplia variedad de especies animales en las semividas de eliminación de fármacos excretados por metabolismo, generalmente se atribuyen a diferencias existentes en las enzimas causantes de la metabolización del fármaco. Sin embargo también se conoce que la unión de fármacos a proteínas plasmáticas puede prolongar, ó acortar la semivida del fármaco dependiendo de la vía por la que el fármaco se elimina (103). La unión de un fármaco a proteínas plasmáticas puede afectar la velocidad de eliminación por alterar el volumen de distribución, ya que es propio que el fármaco libre esté en equilibrio entre el plasma y los

tejidos. El agente beta-bloqueante adrenérgico, propranolol, puede ser elegido como fármaco modelo para estos estudios ya que se elimina enteramente por metabolismo (98, 104) y su semivida es corta a pesar de su gran volumen de distribución. La eliminación de éste fármaco es flujo dependiente y la unión al plasma determina las diferencias encontradas entre individuos con respecto al volumen de distribución y a los semiperiodos biológicos o semividas. Se realizó un estudio sobre la unión de éste fármaco a proteínas plasmáticas en hombre, perro, mono y rata, y se demostró como esta unión acelera la velocidad de eliminación disminuyendo la semivida y el volumen de distribución aparente (101). La unión del propranolol a proteínas plasmáticas se determinó en concentraciones terapéuticas por equilibrio de diálisis, encontrando en hombre un 93,2% de unión, en mono 99,2%, en perro 96,6% y en rata 92,2%. Con respecto a la unión del propranolol a la albúmina era dependiente de la dosis, y siempre inferior a plasma total, encontrando en la albúmina humana una unión que oscilaba entre 51,8-61,5% de unión a concentraciones de 10-1µg/ml. Igualmente se afirmó que la unión de un fármaco a las proteínas plasmáticas puede acelerar la velocidad de eliminación de aquellos compuestos que se eliminan extensivamente de la sangre y que la unión a las proteínas séricas puede afectar la disposición de los fármacos (101). Siguiendo estos estudios, (105) clasifican al propranolol como un fármaco con una cinética particular debido a que su eliminación no está estrictamente basada al fármaco libre en la circulación. De especial interés fue el hallaz-

go de que la unión del fármaco a las proteínas plasmáticas disminuye el volumen de distribución, sin afectar la eliminación del fármaco ó las concentraciones totales estacionarias. El semiperiodo biológico de este fármaco es por lo tanto, función de dos variables independientes, una de la eliminación propia y otra de la unión del fármaco a las proteínas plasmáticas, de tal forma que las diferencias en el semiperiodo biológico no necesariamente pueden predecir las diferencias en las concentraciones estacionarias del fármaco. Los sitios de unión para el propranolol actúan en la circulación como un sistema portador, y aceleran la velocidad de eliminación por promover la liberación del fármaco de los tejidos a su lugar de eliminación en el hígado.

Mientras existe una correlación excelente entre la concentración total de propranolol en plasma y el bloqueo periférico beta-adrenérgico en individuos, existe una considerable variación entre los pacientes con respecto a la efectividad de la concentración plasmática total (98, 106, 107). Esta variación podría atribuirse a diferencias individuales en la sensibilidad del receptor, pero también puede atribuirse a diferencias en la unión del fármaco al plasma ya que generalmente se asume que es el fármaco libre, más que el fármaco total, lo que determina la acción farmacológica. Por lo que se estudia la relación entre las concentraciones libres y totales del propranolol con respecto a la efectividad en antagonizar la taquicardia inducida por isoproterenol en pacientes normales e hi-

pertensos (108). Se observa que el efecto del propranolol sobre el ritmo cardíaco es función predecible de la concentración del fármaco libre y que las variaciones individuales en la sensibilidad al receptor vienen diferenciadas por el requerimiento de dosis órales en relación con variaciones en la biodisponibilidad. En resumen, los factores farmacocinéticos y farmacodinámicos puede contribuir a variaciones individuales a la respuesta al propranolol. Tras la administración oral la mayoría de las variaciones observadas pueden ser atribuidas a factores farmacocinéticos, siendo los más importantes las variaciones en las concentraciones totales alcanzadas en el plasma.

Por todo esto, el conocimiento de la unión del propranolol a proteínas séricas es importante ya que se ha demostrado la correlación entre la concentración sérica total del propranolol y los efectos biológicos en individuos, pero además, existe la problemática de la gran variación encontrada en la efectividad entre pacientes, pareciendo indicar que existe una variación interindividual específicamente en la unión a proteínas séricas (109). En pacientes normales se observa la variación en la unión del propranolol a las proteínas séricas y la influencia de proteínas séricas como albúmina, lipoproteínas y α_1 -ácido-glicoproteína sobre el grado de unión (109); en preparaciones con albúmina y α_1 -ácido-glicoproteína de fracciones séricas obtenidas tras diálisis, los resultados indican un sitio de unión con baja capacidad de unión caracterizada por alta afinidad para el propranolol, y un

segundo sitio con mayor capacidad de unión y con una más baja afinidad para el propranolol. Aunque, en el estudio (105) sobre la unión del propranolol a proteínas séricas que encuentran un porcentaje de unión del 91-95,8% indican que el propranolol se enlazaba principalmente a la albúmina sérica, pero también se señala que se une a otras proteínas plasmáticas. Los resultados revelan que el propranolol se une también significativamente a la α_1 -ácido-glicoproteína sérica (109). Las variaciones interindividuales en la unión, observadas en pacientes, podrían por lo tanto ser causadas por diferencias en las concentraciones séricas de la α_1 -ácido-glicoproteína. Así, diversos pacientes pueden tener concentraciones incrementadas de α_1 -ácido-glicoproteína por procesos de stress (110, 111), inflamación (112), ó por procesos malignos (113), y ésto podría ser la causa de las variaciones encontradas. El incremento en la unión del propranolol a proteínas séricas, producido por una mayor concentración de α_1 -ácido-glicoproteína, puede simultáneamente disminuir el semiperiodo biológico y el volumen de distribución del propranolol (101), así como disminuir la concentración de propranolol libre, y la concentración efectiva biológica sin alterarse la concentración total del fármaco bajo condiciones estacionarias (105).

Los estudios sobre la unión fármaco-proteínas, fenómeno que gobierna los procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos de todo compuesto, son esenciales y ayudan a la interpretación farmacológica.

1.3. Proteinopexia plasmática de tetraciclinas.

Las tetraciclinas constituyen un grupo de antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro de acción, obtenidos por extracción ó semisíntesis que actúan inhibiendo la síntesis proteica bacteriana a nivel de ribosomas, abarcando en su actividad antimicrobiana desde las bacterias hasta los grandes virus.

Todos los antibióticos de la familia de las tetraciclinas tienen la misma constitución química tetracíclica de tipo naftaceno-carboxamida. En su molécula se encuentran dos funciones ácidas: un grupo fenólico y un grupo enólico y por último un grupo dimetil amina y una función carboxamida.

Las tetraciclinas se presentan con un aspecto polvoriento, amarillo, cristalino, más o menos oscuro, alterable a la luz.

Desde el punto de vista de la liposolubilidad se puede agrupar a las tetraciclinas en tres categorías:

- tetraciclinas de liposolubilidad reducida: oxitetraciclina
- tetraciclinas de liposolubilidad muy elevada: doxiciclina, minociclina
- tetraciclinas de liposolubilidad intermedia: tetraciclina, demetilclortetraciclina.

Las tetraciclinas naturales se absorben en el tracto gastrointestinal principalmente a nivel de estómago y de intestino delgado (yeyuno y duodeno). Son estables en medio ácido gástrico y en medio alcalino intestinal, lo mismo que en contacto con los enzimas digestivos, por lo que la forma de administración habitual es la vía oral.

Diferentes análogos de tetraciclinas, tetraciclina, clor-

tetraciclina, oxitetraciclina y demetilclortetraciclina se vienen utilizando ampliamente en terapéutica como agentes efectivos antimicrobianos. Se ha demostrado que con la demetilclortetraciclina se originan en suero mayores niveles y sostenidos de la actividad antibacteriana en comparación con la tetraciclina, clortetraciclina y oxitetraciclina. Es interesante, la apreciación de las diferencias entre las tetraciclinas con respecto a su actividad, propiedades físicas, estabilidad, solubilidad, unión a proteínas plasmáticas, absorción, distribución y excreción "in vivo" y asimismo de su toxicidad. Todas estas diferencias pueden ayudar a determinar cual de ellas puede ser la más óptima para situaciones clínicas particulares.

Las estructuras químicas de estos cuatro análogos difieren unas de otras solamente por la presencia o ausencia de un cloro, o un radical hidroxilo ó metilo. Estas diferencias químicas no van acompañadas por alteraciones en el espectro antibacteriano aunque si se ha señalado en la bibliografía ciertas diferencias en la actividad frente a ciertos organismos asociados con las propiedades físicas de estos compuestos.

Bajo condiciones fisiológicas de temperatura y pH, la clortetraciclina rapidamente se inactiva mientras que los otros análogos son estables. Unicamente la demetilclortetraciclina es estable a 100°C y a pH fuertemente ácido ó alcalino. Factores, tales como diferencias en la solubilidad y afinidad a ciertos tejidos y a plasma sanguíneo, pueden influir en la diferente distribución, acumulacion en ciertos órganos y velocidad de eliminación de estos compuestos.

En la bibliografía se han reportado amplias diferencias

en el semiperiodo biológico tras la inyección i.v. de la tetraciclina. Las divergencias son probablemente debidas en gran parte a los métodos de ensayo y al tiempo seguido para el equilibrio en el organismo antes de aislarse las muestras sanguíneas. Al determinarse los semiperiodos biológicos sanguíneos de estos cuatro análogos de tetraciclinas citados se observa (114), que el mayor semiperiodo biológico era para la demetilclortetraciclina (12,7-11,8 horas, dependiendo de la dosis), seguido en orden por la oxitetraciclina (9,2 horas), tetraciclina (8,5 horas) y clortetraciclina (5,6 horas). Los valores encontrados para la demetilclortetraciclina y tetraciclina corresponden a los previamente reportados (115), y también están de acuerdo con el valor encontrado para la demetilclortetraciclina (116).

Con respecto al volumen de distribución de los análogos de tetraciclinas, se señala un volumen de distribución relativo de la tetraciclina, clortetraciclina y oxitetraciclina de 95, 92 y 90% de peso corporal respectivamente (117). Por el contrario, los valores encontrados por otros autores fueron considerablemente superiores (114). Según estos autores, la oxitetraciclina poseía el mayor volumen de distribución, 189%. La demetilclortetraciclina a dosis de 500 mg alcanzaba un valor de 179% y la tetraciclina, la clortetraciclina y la demetilclortetraciclina a dosis de 250 mg alcanzaban valores de 159, 148 y 148 de peso corporal, respectivamente. La razón de la discrepancia de los valores con la demetilclortetraciclina no es realmente aparente y puede ser debido en parte a las diferencias en el tiempo requerido para el equilibrio. Aunque, estos resultados deben ser interpretados con cierta precaución, no obstante, la gran diferencia en la distri-

bución de la oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina puede ser importante en la interpretación de estudios de absorción oral de estos tres fármacos. El mayor volumen de distribución de la clortetraciclina hace esperar niveles inferiores en sangre con este antibiótico que con los otros dos análogos, aunque tengan el mismo grado de absorción.

También se estudia la unión a proteínas de plasma humano de las cuatro tetraciclinas citadas, por medio de diálisis de equilibrio a concentraciones de 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ (114). Los resultados que aportan señalan que la clortetraciclina y demetilclortetraciclina se unen mas que la tetraciclina y oxitetraciclina. El porcentaje de unión era de 47% para la clortetraciclina y de 42% para la demetilclortetraciclina, mientras que para la tetraciclina era de 24% y para oxitetraciclina de 20%. La evaluación de los análogos de tetraciclinas se realizaron por análisis de actividad antimicrobiana por el método de difusión con disco-placa usando *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 9634 (118). Sin embargo, otros autores (119), por fluorimetría y utilizando mayores concentraciones del antibiótico que las empleadas (114), encuentran para la clortetraciclina valores de 65-70% de unión a las proteínas plasmáticas (especialmente con la albúmina).

Con respecto a la excreción urinaria, se observa que en los estudios de excreción renal el más rápidamente eliminado es la oxitetraciclina (85%) seguido en orden por la tetraciclina (62%) y por la clortetraciclina y demetilclortetraciclina (alrededor de un 30%) porcentaje con respecto a la eliminación simultánea de creatinina (114). Estos resultados, concuerdan con los previamente reportados en un estudio de absorción oral (115) (tetraciclina

71%, y demetilclortetraciclina 31% de la depuración urinaria simultánea de creatinina respectivamente).

De estos resultados, es razonable asumir que la excreción urinaria de los análogos de tetraciclina puede variar en pacientes con fallo renal. Así, la oxitetraciclina sería uno de los más rápidamente excretados en orina, en pacientes con fallo renal. Y la tetraciclina únicamente se excretaría de forma ligera. La demetilclortetraciclina puede esperarse que se retenga en sangre, en pacientes urémicos mientras que la actividad de la clortetraciclina podría ser rápidamente disipada y muy poca cantidad podría aparecer en la orina.

La minociclina es otro miembro de la serie de tetraciclinas con un alto nivel de actividad frente a organismos sensibles a la tetraciclina y una actividad muy significativa frente a stafilococos resistentes a la tetraciclina. Se demuestra en el hombre que el semiperíodo biológico de este compuesto es apreciablemente superior que el de las otras tetraciclinas (120). La minociclina se absorbe rápida y completamente, tiene un alto semiperíodo biológico por lo que puede tener una penetración tisular favorable. Las características de la penetración tisular de la minociclina, en el hombre, concuerdan con la del perro en estudios realizados en tejidos y en fluidos orgánicos (121). La minociclina tiene una rápida penetración tisular, rápida tras una dosis única oral en ratas (122). A la hora, la concentración en todos los tejidos estudiados era superior a la concentración en sangre. Otros autores (123), sugieren que el incremento lipofílico en la tetraciclina puede originar una mayor concentración tisular y que la unión a proteínas puede no estar proporcionalmente incrementa-

da. Una ventaja del alto caracter lipofilico de una tetraciclina puede ser postulada en términos de una mayor eficacia terapéutica, es decir, la existencia de una concentración potencial rápida y alta del antibiótico en el organo de impacto. También señalan (123), valores de un 56 y 82% de unión de la tetraciclina y doxiciclina a proteínas séricas humanas. Se apunta para la minociclina un 76% de unión sugiriendo que con concentraciones séricas comparables, el fármaco libre útil para la penetración tisular es mayor para la tetraciclina que para la minociclina y doxiciclina (120). Sin embargo, debido a que el coeficiente de partición de la tetraciclina entre una fase acuosa y una fase lipídica está más a favor de la fase acuosa, la penetración tisular de la tetraciclina demostrada en animales (124) es menor que para la minociclina o doxiciclina por lo que el más alto caracter lipofílico y la más baja unión a proteínas de la minociclina comparada con la doxiciclina sugiere una penetración tisular más favorable para la minociclina.

Asimismo, se estudia la excreción renal de la minociclina encontrando valores menores que para otras tetraciclinas estudiadas (120). El más alto porcentaje de minociclina excretado fue en heces, por el contrario encuentran una biotransformación para la minociclina superior que con otras tetraciclinas.

Lo que es evidente es que la interacción de fármacos con proteínas plasmáticas viene siendo objeto de numerosas investigaciones. Los antibióticos han recibido una atención especial debido a la implicación existente de la unión a proteínas en importantes acciones farmacológicas. Diversos mecanismos tales como, quelación, adsorción y unión iónica e hidrofóbica se han propues-

to para la unión de las tetraciclinas a la albúmina sérica (125, 126).

Recientes estudios (127), han establecido la espectrometría como una herramienta poderosa de trabajo para delucidar alteraciones conformacionales de las proteínas tisulares. Los diferentes espectros para las tetraciclinas fueron dependientes de las características de los sustituyentes en el anillo.

Es conocido que la unión de los agentes antimicrobianos a las proteínas séricas y a los tejidos extravasculares afecta a la distribución, eliminación y actividad farmacológica de dichos agentes. En general el porcentaje de unión de fármacos a proteínas séricas es dependiente de la concentración del fármaco y de la concentración de proteína, no obstante variaciones en las concentraciones del fármaco dentro de un rango terapéutico apenas tienen efecto sobre el porcentaje de unión. La unión de los agentes antimicrobianos a proteínas séricas puede originar un importante problema clínico, en aquellos casos en que provoque unos niveles de fármaco libre reducidos por debajo de las concentraciones mínimas inhibitorias de microorganismos susceptibles, aunque en muchos casos, una alta unión a proteínas puede estar compensada si el agente posee una mayor actividad antimicrobiana intrínseca y un mayor carácter lipofílico.

La unión fármaco-proteína puede ser reducida por la presencia de otros fármacos y también por sustancias endógenas, que fundamentalmente pueden estar implicadas en casos de fallo renal o hepático y en diversas alteraciones patológicas asociadas con una elevación de ácidos grasos libres. Es obvio señalar que las mayores reducciones en la unión a proteínas se observarán con fármacos que están unidos muy altamente.

Por otro lado, la eliminación renal de los agentes antimicrobianos está marcadamente influenciada por su unión a proteínas séricas fundamentalmente si el principal mecanismo de excreción es por filtración glomerular. Por el contrario, la unión a proteínas séricas tendrá menos efecto sobre la excreción tubular renal y por excreción hepática.

Se estudia la unión de la demetilclortetraciclina y de la clortetraciclina al plasma humano (114, 128) y al plasma de perro (129). Los resultados encontrados no son concordantes y se observan distintos valores para un antibiótico específico y para diferentes especies animales.

En un estudio comparativo de la unión de la demetilclortetraciclina con la clortetraciclina y tetraciclina a plasma humano y plasma de perro (130), el porcentaje de unión se valoró por diálisis de equilibrio a concentraciones del fármaco dentro de los niveles terapéuticos y bajo condiciones fisiológicas de temperatura y pH. El efecto de la temperatura y pH sobre la unión de la tetraciclina también fue estudiado. Se demuestra que las tetraciclinas (clortetraciclina, demetilclortetraciclina y tetraciclina) se unen en un grado similar al plasma humano y al plasma de perro a diferencia de otros fármacos, por ejemplo, las sulfonamidas que se unen más al plasma humano que al plasma de perro. El orden de la tendencia a incrementar la unión es tetraciclina ----> demetilclortetraciclina ----> clortetraciclina, resultados concordantes con los anteriormente reportados (114,128). El porcentaje de unión de la tetraciclina al plasma de perro fue significativamente inferior al señalado (129). El grado de unión de las tres tetraciclinas al plasma humano y al de perro no varía dentro de un rango de

concentraciones del antibiótico de 1-10 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados encontrados en este estudio fueron con plasma de perro el porcentaje de fármaco unido fue: para la tetraciclina $36\% \pm 3$, para la demetilclortetraciclina $48\% \pm 2$ y para la clortetraciclina $58\% \pm 5$ y con plasma humano fue para la tetraciclina $32\% \pm 4$, demetilclortetraciclina $51\% \pm 2$ y para la clortetraciclina $64\% \pm 4$. Asimismo, observan que cuando el pH varía de valores 6,7 a 8,1 no existe un incremento apreciable en la unión de las tetraciclinas con respecto al incremento de la alcalinidad.

En conclusión, se puede apuntar, que los resultados discordantes que aparecen en la bibliografía con respecto a la unión de las tetraciclinas a proteínas plasmáticas pueden estar afectados por las concentraciones del fármaco, por la concentración de las proteínas plasmáticas, por las distintas especies animales, por el pH, temperatura y buffer empleado.

Por otra parte, la literatura señala como problema clínico que los antibióticos del grupo de las tetraciclinas se unen a proteínas séricas con las consiguientes reducciones en su potencia biológica (131,119). Mientras que, muchos investigadores (119) consideran que el enlace primario de la tetraciclina es con la albúmina, otros señalan que las tetraciclinas forman complejos con todas las fracciones proteicas, a excepción de la globulina. Por otro lado, se demuestra (123) que la tetraciclina se une con igual facilidad a la albúmina que a la gamma globulina.

Finalmente señalaremos por sus estudios sobre la interacción de la tetraciclina tritiada con proteínas sérica humana a concentración terapéutica por diálisis y por cromatografía (132), se encuentra en suero, que el 53% de la tetraciclina está en forma de complejos con proteínas: 54% con albúmina, 13% con lipopro-

teínas de baja densidad; 19% con lipoproteínas de alta densidad; 6% con lipoproteínas de muy alta densidad; y 8% con otras proteínas séricas. La albúmina posee dos sitios de enlace para la tetraciclina uno de alta afinidad, sitio de baja capacidad, y el otro de baja afinidad, sitio de alta capacidad. A concentraciones terapéuticas las tres cuartas partes de la tetraciclina unida a la albúmina está asociada con el sitio de baja afinidad.

1.4. Justificación del tema elegido.

Las interacciones farmacocinéticas pueden ser clasificadas principalmente como aquellas que afectan los mecanismos de

- a) absorción gastrointestinal
- b) tiempo de distribución. Proteinopéxia plasmática
- c) metabolismo: inducción ó inhibición
- d) excreción renal.

El proposito del presente trabajo no es el estudiar de una forma extensiva todas las interacciones posibles entre los fármacos quinidina y propranolol frente a una serie de tetraciclinas sino unicamente observar las interacciones que afectan la unión a proteínas plasmáticas con el fin de dar una visión de este fenómeno que puede influir directamente en el aspecto farmacodinámico de estos fármacos, conocimiento básico para la práctica clínica.

Muchos fármacos son ampliamente unidos a las proteínas plasmáticas y generalmente se acepta que la fracción de fármaco libre (la no copulada a proteínas) es la difusible y lleva inherente la actividad farmacológica. Estudios "in vitro" han suministrado evidencia del desplazamiento de un fármaco de sus lugares de unión en la albúmina por otros fármacos (4,133) y este fenómeno ha sido extrapolado para sugerir si este hecho puede ser la cuasa de un incremento en el efecto farmacológico en tratamientos combinados en pacientes. Se investigó la interacción entre la indometacina y warfarina (134). No encontraron ninguna potenciación del efecto hipoprotrombinémico de la warfarina tras la administración de indometacina, a pesar del hecho de que la indometacina desplaza a la warfarina de sus lugares de unión "in vitro"

(4,133). Existen también medicamentos cuyas concentraciones séricas guardan una perfecta correlación con la intensidad de sus efectos farmacodinámicos pero no con sus efectos clínicos. Este es el caso de la warfarina cuyos niveles plasmáticos se corresponden con el grado de inhibición de la síntesis hepática de los factores de coagulación sensibles a vitamina K pero no con la concentración del complejo de protrombina en el plasma; aunque este último es medido por el "tiempo de protrombina" su valor sin embargo no refleja solo la mencionada síntesis sino también el catabolismo de dichos factores proteicos y es este un lento proceso que no es afectado por warfarina (135).

Por otra parte, se ha observado para el caso de tratamiento conjunto de sulfadimetoxina y tolbutamida en estudios de ultrafiltración "in vitro", que la tolbutamida libre se aumenta en un 100% y el volumen de distribución en un 35%. Para explicar la interacción se ha propuesto un mecanismo idéntico que para la interacción entre el hidrato de cloral y la warfarina. Durante el tratamiento con hidrato de cloral, un metabolito, el ácido tricloroacético se acumula y este metabolito desplaza a la warfarina de sus lugares de unión "in vitro". Si bien, el efecto en concreto de este desplazamiento puede ser un fenómeno temporal ya que muchos investigadores no han podido explicar el porque no se encuentra ninguna interacción significativa clínica entre la warfarina y el hidrato de cloral.

Otro es el caso de la fenilbutazona que se conoce que potencia el efecto hipotrombinémico de la warfarina. Esta interacción se cita a menudo como un ejemplo típico de una interacción que implica el desplazamiento de la unión a proteínas. Sin embar-

go, por recientes estudios sobre el efecto de la fenilbutazona sobre el tiempo de protrombina y sobre la potenciación del efecto anticoagulante de la warfarina por la fenilbutazona, parece que el desplazamiento de los lugares de unión a las proteínas únicamente tiene un efecto clínico continuado y pronunciado cuando otros mecanismos tales como la inhibición del metabolismo del fármaco están implicados. Así es el caso del clorfibrato que potencia el efecto hipotrombinémico de anticoagulantes tipo cumarina. El clorfibrato no solamente desplaza al dicumarol de su unión a proteínas sino que también inhibe su metabolismo.

En general siempre es conveniente tener en cuenta los resultados cuantitativos de los hallazgos "in vitro" para una extrapolación a una situación "in vivo". La disminución de la unión de un fármaco a proteínas plasmáticas, por lo general, puede ser cuantitativamente significativa, únicamente para aquellos fármacos que están altamente unidos a las proteínas, probablemente mas de un 90%, y que también poseen un volumen de distribución pequeño del orden de 0.15 l/kg (136). Un incremento de la fracción de fármaco no copulado en plasma capacita al fármaco libre para difundirse a los tejidos con un incremento consecuente en el volumen de distribución (137). Generalmente un significado clínico de la interacción farmacológica no debe ser esperado con compuestos que se unen altamente a proteínas si su volumen de distribución es grande, ya que únicamente una pequeña fracción del fármaco en el organismo se encontrará en plasma.

Por otra parte poco se conoce acerca de las posibles interacciones de los fármacos con las proteínas hícticas y estas consideraciones suelen ir orientadas a un interés más bien teóri-

co. Es de notar cuanta importancia tiene el concepto del "aclaramiento intrínseco", puesto que ello nos va a explicar de que no necesariamente un porcentaje elevado de unión a proteínas tenga que ir acompañado de una vida media prolongada. Cloxacilina y dicloxacilina con una proteinopéxia de 95% y 98% respectivamente poseen una vida media de 30 minutos en contraste con warfarina con cifras análogas de proteinopéxia tiene una vida media de 35-54 horas.

El aclaramiento conceptuado globalmente como la suma de los aclaramientos parciales de cada órgano (hígado, riñón, cerebro, miocardio, etc...) posee tal importancia que los medicamentos que lo aumentan producen iguales efectos que los fenómenos de inducción enzimática (disminución de niveles plasmáticos y aumento de tolerancia) y los medicamentos que lo deprimen producen análogos efectos que los fenómenos de inhibición enzimática (aumento de niveles plasmáticos, disminución de tolerancia y aumento de los índices de farmacotoxicidad)(138).

Sin embargo, estas interacciones implican a su vez un desplazamiento de la proteinopéxia por lo que es importante y necesario el conocer este fenómeno que podría ser la causa de un incremento del efecto farmacológico del fármaco desplazado.

Nosotros pensamos que futuras investigaciones ayudarán a demostrar la importancia clínica de las interacciones farmacológicas que afectan a la unión de proteínas. Por todo ello, se ha orientado y se ha realizado el estudio de la interacción entre la quinidina y el l-propranolol con una serie de tetraciclinas en lo que respecta a su unión a la albúmina bovina "in vitro" observándose el posible desplazamiento.

MATERIAL

Y

METODOS

2.1. Método general para el estudio de la farmaco-proteinopexia.

Las condiciones experimentales que hemos seguido en el desarrollo de nuestro trabajo han sido las siguientes, para cada fármaco y concentración; hemos preparado 8 tubos de ensayo a los que hemos añadido:

- 0,6 ml. de Buffer fosfato pH = 7,4
- 2 ml. de albúmina bovina correspondiente a una concentración de 44 mg/ml., concentración fisiológica que se ha mantenido a lo largo del desarrollo de la investigación, ya que alteraciones en estos factores pueden afectar la unión.
- 1 ml. del fármaco, (en el caso de 2 fármacos para los estudios de interacción hemos añadido 0,5 ml. de cada uno de ellos) a las concentraciones elegidas para este estudio.
- y el resto agua destilada y desionizada hasta completar un volumen de 6 ml.

Seguidamente se agitan las muestrans con objeto de homogeneizar el contenido y se procede a la incubación en un baño de Heron con agitación a 37°C durante el tiempo necesario en cada caso para alcanzar el equilibrio.

Acabado el periodo de incubación, transferimos el contenido de los tubos a las células de un sistema de carrusel múltiple (Millipore) para la ultrafiltración, recogiendo el filtrado y desechando la primera fracción, 0,5 ml., con objeto de eliminar los efectos de las pérdidas inespecíficas de adsorción que pudieran presentarse. Se toman partes alicuotas de 1 ml. de los respectivos filtrados y pasamos a la preparación de dichas muestras para la determinación analítica cuantitativa de la fracción del

fármaco no unido a la seroalbúmina bovina.

2.2. Determinación de la proteinopexia por ultrafiltración.

De todos es conocido que los fármacos se fijan a las proteínas plasmáticas dando origen a verdaderos complejos de unión fármaco-proteína (139).

Nosotros hemos calculado el porcentaje de unión de diversos fármacos estudiados mediante la técnica de filtración molecular. Se ha demostrado (17,56,66,140,141,142,143) que dicho método reúne como ventajas su simplicidad, rapidez, seguridad y precisión respecto a los métodos tradicionales como pueden ser los de: equilibrio de diálisis (144,145), filtración a través de gel (26), electroforesis (146,147) elución frontal (148), etc... Además utilizando membranas de tipo Pellicon PSED se requieren volúmenes pequeños, por lo que se necesita menos cantidad de muestra y se evitan anomalías frecuentes de las técnicas convencionales anteriormente citadas.

El presente estudio se ha realizado mediante un sistema de Carrusel múltiple de filtración molecular directa (Millipore). Este sistema se halla equipado con células de 17 ml. de capacidad (Fig. 1), dotadas de agitación magnética que permite una mejor distribución de la molécula en el lecho de unión y un aumento de la velocidad de flujo. Simultáneamente, se aplica una presión con nitrógeno sobre el fluido por encima de la membrana, con el objeto de no solo favorecer el paso de las moléculas permeables a través del filtro sino también contribuye a elevar el flujo de filtración.

Es importante evidentemente la óptima elección de mem-

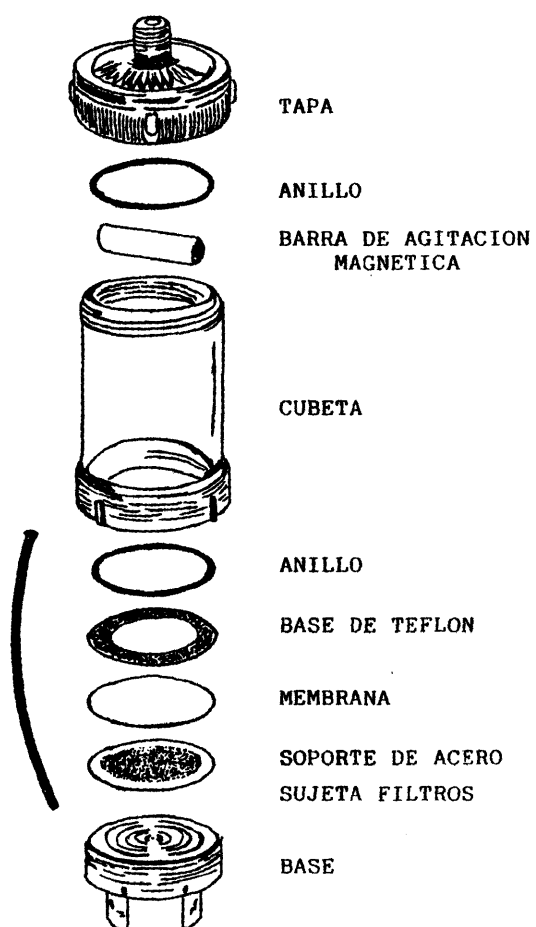


FIGURA 1

branas, con una dimensión de poro adecuado, factor determinante en la retención y paso de las diferentes moléculas en la filtración. Por lo tanto se elegirá el tipo de membrana que retenga el complejo de unión fármaco-proteína y al agente adsorbente ó proteína libre, y que al mismo tiempo facilite el paso de las moléculas libres del soluto ó fármaco a estudio. Para la elección de dichas membranas se consideran dos factores específicos: la retención y la velocidad de flujo. La Fig. 2 expresa la variación de la capacidad de retención de las membranas moleculares tipo Pellicon en función del peso molecular de un determinado compuesto. Se observa la fracción de soluto que queda retenida por una determinada membrana y nos relaciona el tanto por ciento de retención con respecto al peso molecular de un compuesto específico. En general si las membranas son de poro ancho darán flujos más rápidos que los flujos moleculares obtenidos con poro fino. En ocasiones se suele sacrificar algo de retención con el objeto de alcanzar una mayor rapidez en la experimentación. En nuestro estudio hemos utilizado filtros tipo Pellicon PSED que aunque no se alcanza con ellos una retención completa de la proteína como sucedería con los filtros tipo PSAC, las pérdidas resultan inferiores a un 3% y en cambio se facilita significativamente la velocidad de filtración.

Los resultados obtenidos experimentalmente se representan y se interpretan de acuerdo a criterios que permiten expresar en terminos comparativos las características de la unión.

Las características cinéticas que ofrecen mayor interés son la constante de asociación (K) y el número de puntos de unión (N).

Normalmente, al considerar la unión a proteínas como un

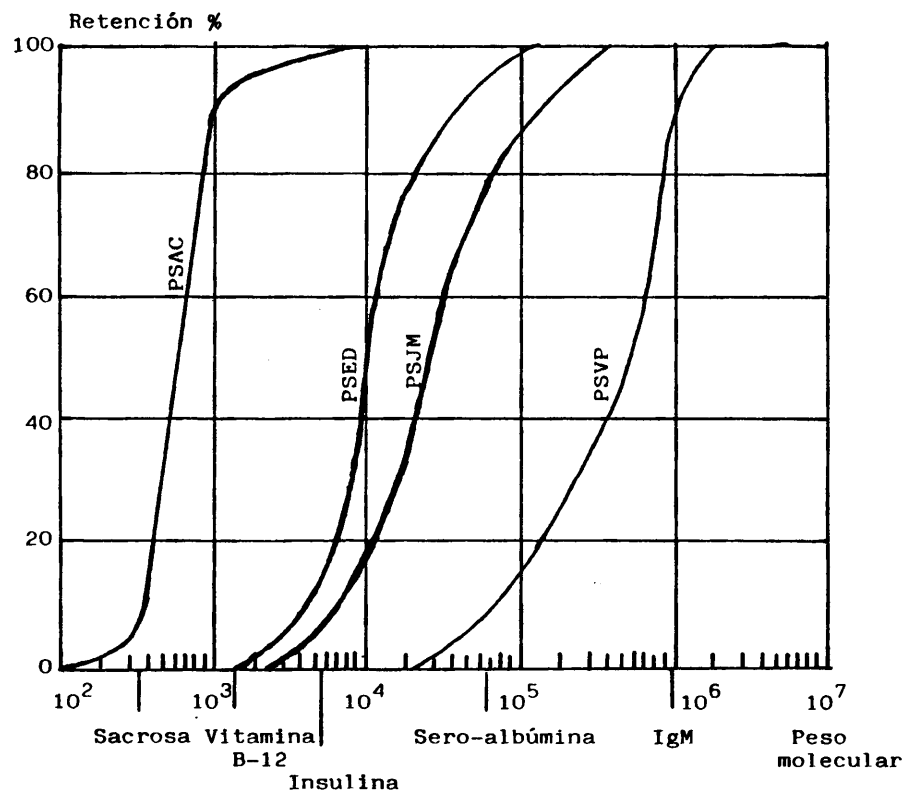
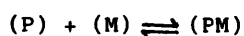


Fig. 2.- Variación de la capacidad de retención de las membranas moleculares Pellicón en función del peso molecular.

proceso simple reversible, se puede aplicar teóricamente la ley de acción de masas, según la cual:



en la que:

(M) = concentración de medicamento libre

(P) = concentración de proteína libre

(PM) = concentración del complejo medicamento-proteína

Al alcanzarse el equilibrio, la constante de asociación según la ley de acción de masas vendrá dada por:

$$K = \frac{(PM)}{(P)(M)}$$

ó lo que es lo mismo:

$$(PM) = K (P) (M)$$

Si llamamos r a la relación existente entre moles de medicamento unido y moles totales de proteína, ó lo que es lo mismo, moles de medicamento fijado por mol de proteína, se cumple para cada unión, la igualdad:

$$r = \frac{\text{moles medicamento unido}}{\text{moles totales proteína}} = \frac{(PM)}{(PM)+(P)} = \frac{K (P) (M)}{K (P) (M)+(P)} = \frac{K (M)}{K (M)+1}$$

Si existen N puntos de unión a la molécula específicamente de la seroalbúmina, con la constante intrínseca igual en todos ellos, y en ausencia de interacción entre moléculas fijadas a las proteínas, la relación que puede ser establecida entre r y M es:

$$r = \frac{K (M)}{1 + K (M)}$$

Si el número de puntos de unión independientes e idénticos es N, se puede escribir una serie de ecuaciones independientes cuya suma será:

$$r_1 + r_2 + \dots + r_N = r_{\text{total}} = \frac{NK(M)}{K(M) + 1} \quad (a)$$

A menudo hay mas de un tipo de sitios de unión en una proteína, cada uno con su propia constante de asociación, por lo que la ecuación general será:

$$r_{\text{total}} = \frac{N_1 K_1(M)}{1 + K_1(M)} + \frac{N_2 K_2(M)}{1 + K_2(M)} + \dots + \frac{N_N K_N(M)}{1 + K_N(M)}$$

Luego si representamos M (que puede ser determinado analíticamente) frente a r (que puede ser determinado para cada punto experimental), obtendremos el trazado correspondiente a una hipérbola, a través de la cual se podrían determinar los parámetros N y K que caracterizan la interacción medicamento-proteína.

Con el fin de utilizar líneas rectas, para operar mas comodamente, se realizan modificaciones sencillas que conducen a la representación doble-recíproco y la de Scatchard.

En nuestros cálculos hemos empleado la de Scatchard (8, 38,40), por ser la forma mas frecuente y convencional de representación de los resultados experimentales.

De la ecuación (a) se deduce:

$$r + r K(M) = N K(M)$$

Si dividimos ambos miembros de la ecuación por M tenemos:

$$\frac{r}{M} + r K = N K$$

despejando el valor de $\frac{r}{M}$:

$$\frac{r}{(M)} = N K - r K$$

que es la ecuación de Scatchard.

En la representación gráfica si en abscisas tomamos los valores de r y en ordenadas la relación $\frac{r}{M}$, la pendiente es igual a la constante de asociación K , la abscisa en el origen es el valor del número de sitios de unión N y la ordenada en el origen es el valor del producto del número de puntos independientes de unión por la constante de asociación.

Si el trazado experimental no es una línea recta, se interpreta como que existen al menos dos clases de puntos de unión a la molécula de albúmina; en algunos casos se han encontrado hasta tres clases de puntos de unión. Estas curvas las podemos considerar como suma de dos ó mas líneas rectas. Cada recta significa una clase diferente de sitios de unión, con sus respectivos valores de K y N .

La curva como sucesión de rectas con distinta orientación, podría formularse:

$$r = \frac{N_1 K_1 (M)}{1 + K_1 (M)} + \frac{N_2 K_2 (M)}{1 + K_2 (M)}$$

La representación de Scatchard de esta ecuación nos lleva a la curva teórica (Fig. 3) que es la suma de dos líneas rectas (I, II) representada por las dos clases. La Fig. 3 expresa una curva característica para el caso de la unión del ácido salicílico a la seroalbúmina bovina.

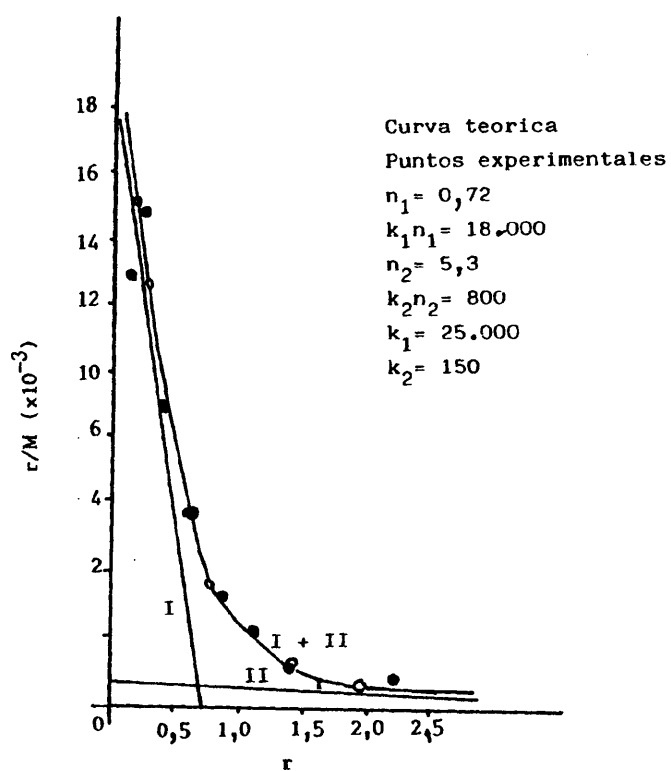


Fig. 3.- Unión del ácido salicílico a la seroalbúmina bovina. (Curva I : $n_1 = 0,72$, $k_1 = 25.000$, Curva II: $n_2 = 5,3$, $k_2 = 150$)

2.3. Determinación de la proteinopexia por precipitación con ClO_4H .

Se ha utilizado para el estudio de unión del 1-propranolol- ^3H a la seroalbúmina bovina y para el estudio de la interacción de una serie de tetraciclinas sobre esta unión el método de precipitación con ClO_4H . Esta temática clásica y convencional se ha elegido por su simplicidad y fácil manejo a la hora de realizar un análisis cuantitativo radiométrico.

Las condiciones experimentales que hemos seguido en el desarrollo de esta temática fueron:

En minutubos de vidrio de 2 ml. se situa un volumen total de 1,5 ml. que contiene: 0,2 ml. de Buffer fosfato (pH 7,4); 0,5 ml. de seroalbúmina bovina a una concentración final de 44 mg/ml; 0,25 ml. de los fármacos a estudio a la concentración elegida y el resto hasta 1,5 ml. se añade agua destilada y desionizada.

Por otra parte se preparan muestras para el conteo de fondos añadiendo 0,2 ml. de Buffer fosfato (pH 7,4); 0,5 ml. de seroalbúmina bovina (concentración final 44 mg/ml.) y el resto hasta 1,5 ml. se añade agua destilada y desionizada. Seguidamente se agitan las muestras para una total redistribución del medio y se incuban a 37°C durante media hora en un baño Heron con agitación. Tras el periodo de incubación se añade a cada vial 0,2 ml. de ácido perclórico al 10% con objeto de precipitar la fracción de proteína no unida a los fármacos a estudio. Se centrifuga a 4.000 rpm durante 15 minutos y del sobrenadante en cada vial se toma 0,1 ml. para su posterior análisis cuantitativo por conteo radiactivo.

2.4. Determinaciones analíticas.

2.4.1. Determinación analítica de la quinidina.

Para el análisis cuantitativo de la quinidina hemos utilizado dos métodos: uno espectrofotométrico y otro espectrofluorimétrico de doble extracción (80).

Método espectrofotométrico:

Este método se ha realizado en un espectrofotómetro Beckman Mod. 25. El espectro (Fig. 4) realizado tomando cloroformo como blanco nos ha servido para determinar el valor máximo de absorción resultando ser a la longitud de onda de 335 nm. Para la curva de calibrado se preparan muestras en cloroformo a concentraciones comprendidas entre $5,55 \cdot 10^{-3}$ y $2,71 \cdot 10^{-6}$ M, leyendo la absorbancia a 335 nm frente a cloroformo. Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla I y Fig. 5. Por este método no se han podido detectar concentraciones por debajo de 3×10^{-6} M.

TABLA I

Concentración (M)	Absorbancia a 335 nm
$5,55 \cdot 10^{-3}$	1,086
$1,39 \cdot 10^{-3}$	0,946
$1,11 \cdot 10^{-3}$	0,876
$5,55 \cdot 10^{-4}$	0,880
$2,77 \cdot 10^{-4}$	0,765
$2,22 \cdot 10^{-4}$	0,749
$1,39 \cdot 10^{-4}$	0,547
$1,11 \cdot 10^{-4}$	0,440
$8,41 \cdot 10^{-5}$	0,340
$5,54 \cdot 10^{-5}$	0,230
$2,77 \cdot 10^{-5}$	0,127
$2,71 \cdot 10^{-6}$	0,037

-58-

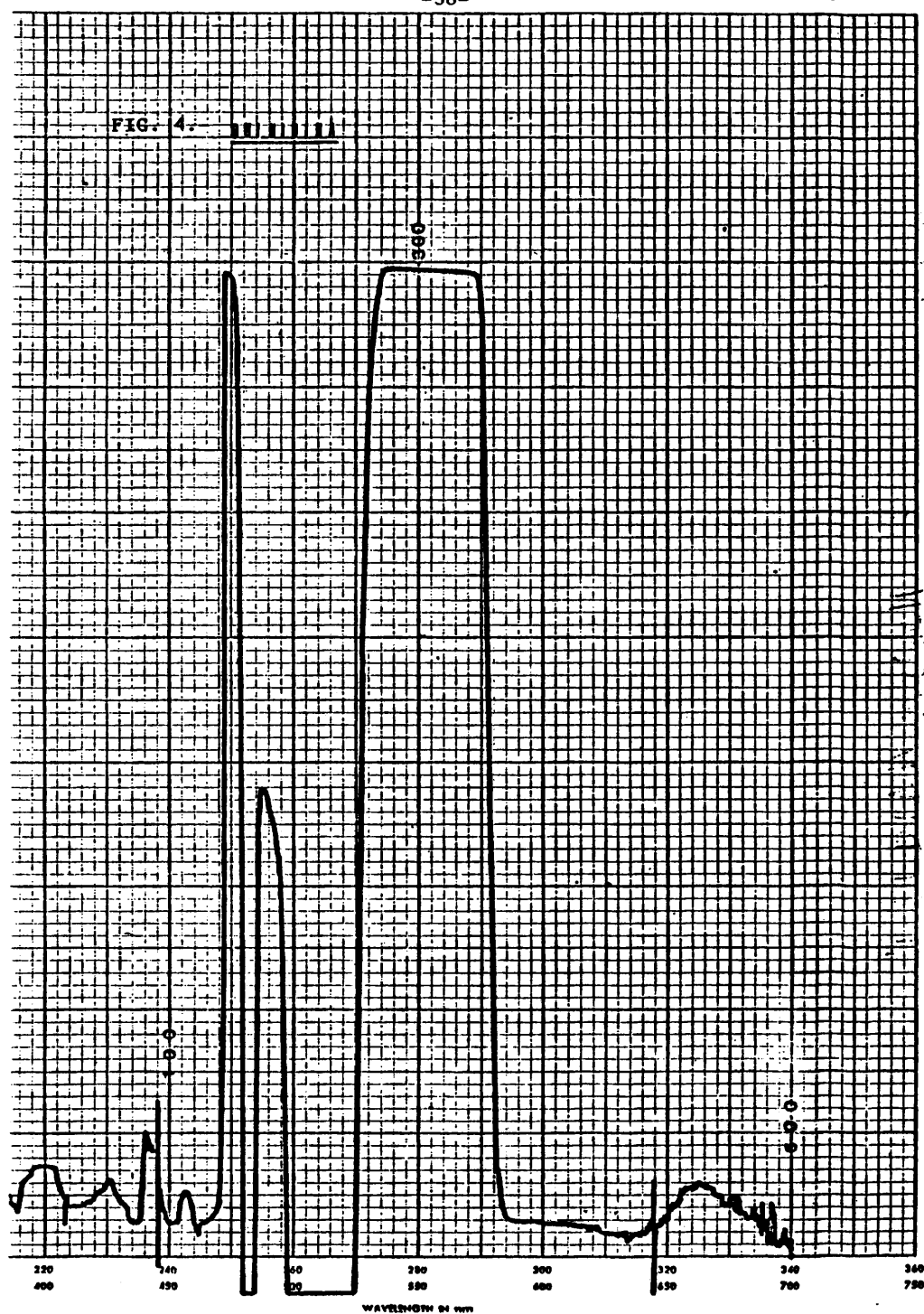
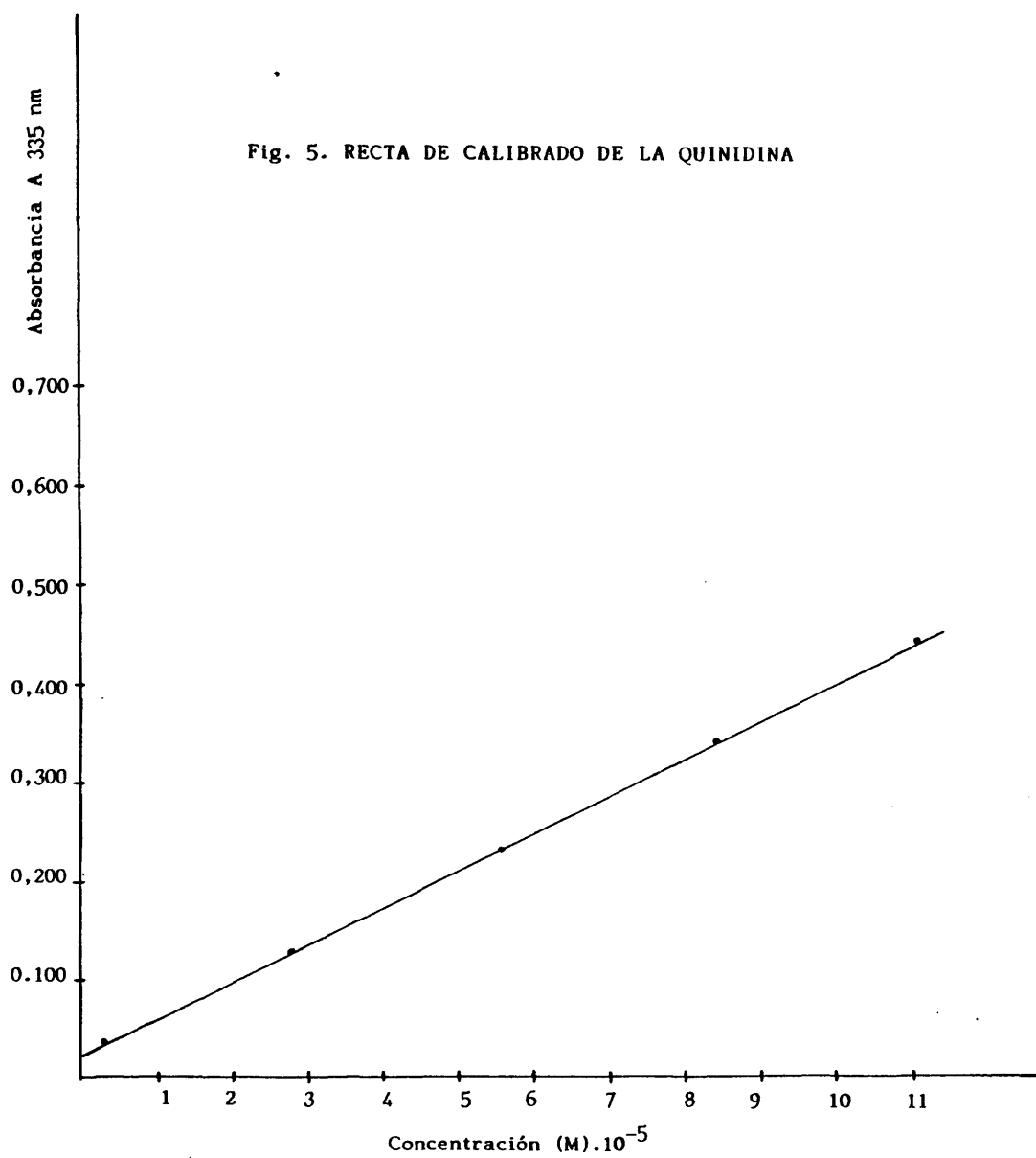


Fig. 5. RECTA DE CALIBRADO DE LA QUINIDINA



Método espectrofluorimétrico.

El método de doble extracción de KESSLER (80) método de CRAMER (149) modificado es el que hemos utilizado para la determinación de la quinidina en el estudio de proteinopé- xia ya que este método posibilita detectar cantidades del orden de $0,5 \cdot 10^{-6} M$ que están dentro del rango terapéutico, y que se ha realizado en un espectrofluorímetro Aminco-Bow- man.

Procedimiento.

- 1) En tubos de 25 ml. de capacidad se introducen 0,5 ml. de filtrado, se le añade 1 ml. de NaOH 0,1N y a conti- nuación se añaden 7,5 ml. de benceno.
- 2) Se agitan los tubos vigorosamente durante 5 minutos y se centrifugan a 300 rpm durante 10 minutos.
- 3) Se transfiere el extracto claro de benceno (fase supe- rior) a tubos de 25 ml. conteniendo 5 ml. de SO_4H_2 0,1N.
- 4) Se agita vigorosamente durante 5 minutos y se centrifu- ga a 300 rpm durante 10 minutos.
- 5) Se transfiere el extracto de ácido sulfúrico (fase infe- rior) a una cubeta de 10 mm. de vidrio (Zeiss OS) y se lee la fluerescencia a 4600 \AA . Se standariza el aparato con 0,67 mg. de quinidina por litro de SO_4H_2 0,1N que corresponden a una intensidad de 100, correspondiendo a una concentración de 10 mg. de quinidina por litro de plasma. Se usa SO_4H_2 0,1N como blanco. Longitud de onda de excitación 365 nm y de emisión 460 nm.

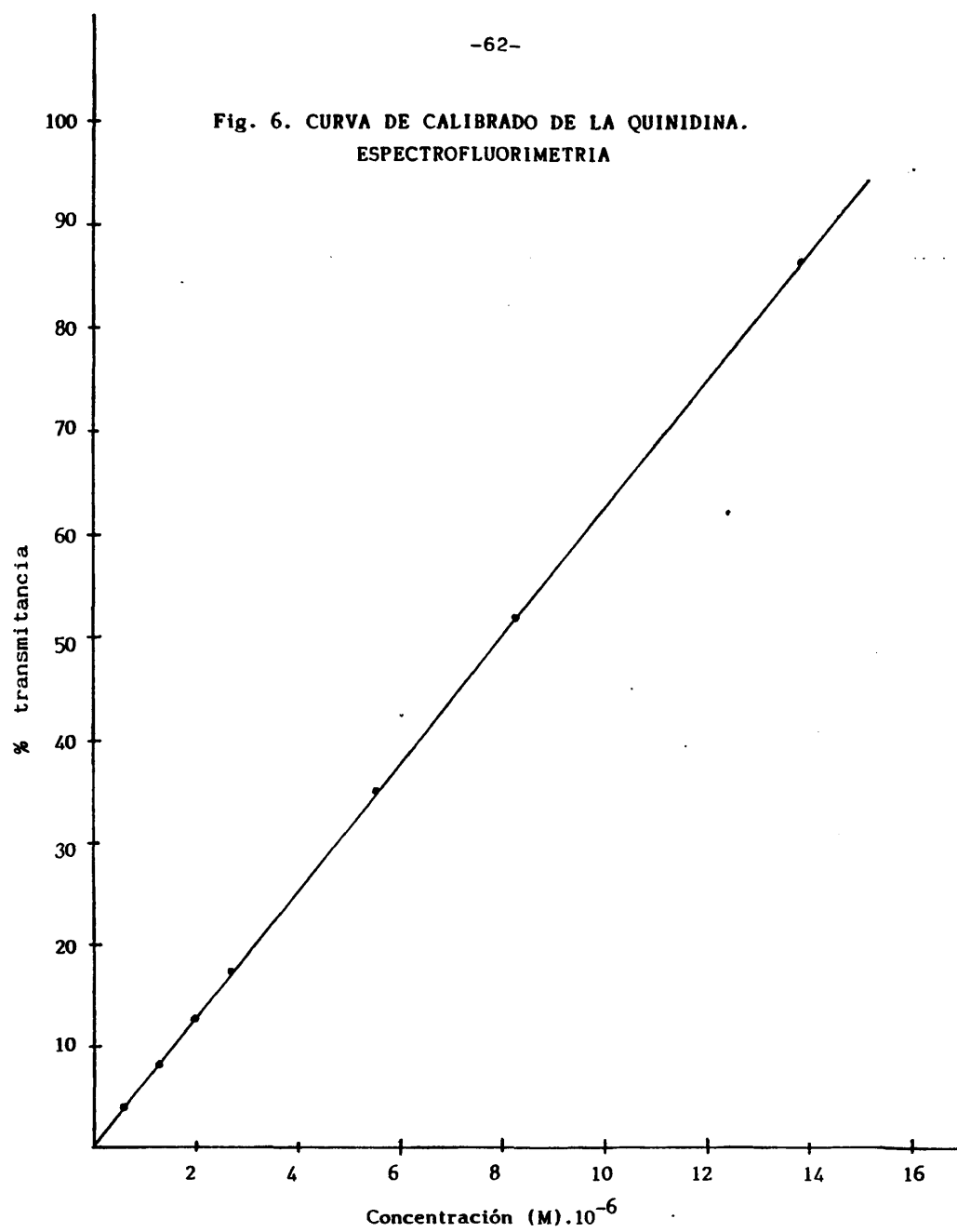
Para la curva de calibrado se realizaron medidas a con-

centraciones comprendidas entre $0,60 \cdot 10^{-6} \text{M}$ y $13,80 \cdot 10^{-6} \text{M}$.
Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla II y Fig.
6.

TABLA II

Concentración (M)	% de transmitancia fijado a 365 nm de excitación y 460 nm de emisión.
$0,60 \cdot 10^{-6}$	4,14
$1,30 \cdot 10^{-6}$	8,22
$2,00 \cdot 10^{-6}$	13,30
$2,70 \cdot 10^{-6}$	17,30
$5,50 \cdot 10^{-6}$	35,02
$8,30 \cdot 10^{-6}$	52,05
$13,80 \cdot 10^{-6}$	86,25

Fig. 6. CURVA DE CALIBRADO DE LA QUINIDINA.
ESPECTROFLUORIMETRIA



2.4.2. Determinación analítica de la clortetraciclina.

La determinación analítica cuantitativa de este compuesto ha sido realizada espectrofotométricamente, en un espectrofotómetro Beckman Mod. 25.

El valor máximo de absorción se obtuvo tras realizar el espectro correspondiente (Fig. 7). El máximo de absorción fue fijado a la longitud de onda de 368 nm a la luz visible.

Para la curva de calibrado se preparan una serie de concentraciones de clortetraciclina comprendidas entre 2,09. 10^{-4} M y 4,18. 10^{-6} M en soluciones acuosas, y se lee la absorbancia a 368 nm directamente en el espectrofotómetro, utilizando como blanco agua.

Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla III y en la Fig. 8.

TABLA III

Concentración (M)	Absorbancia a 368 nm
2,09. 10^{-4}	1,259
1,04. 10^{-4}	0,912
8,35. 10^{-5}	0,781
6,26. 10^{-5}	0,600
4,18. 10^{-5}	0,400
2,09. 10^{-5}	0,201
1,67. 10^{-5}	0,160
8,35. 10^{-6}	0,078
4,18. 10^{-6}	0,038

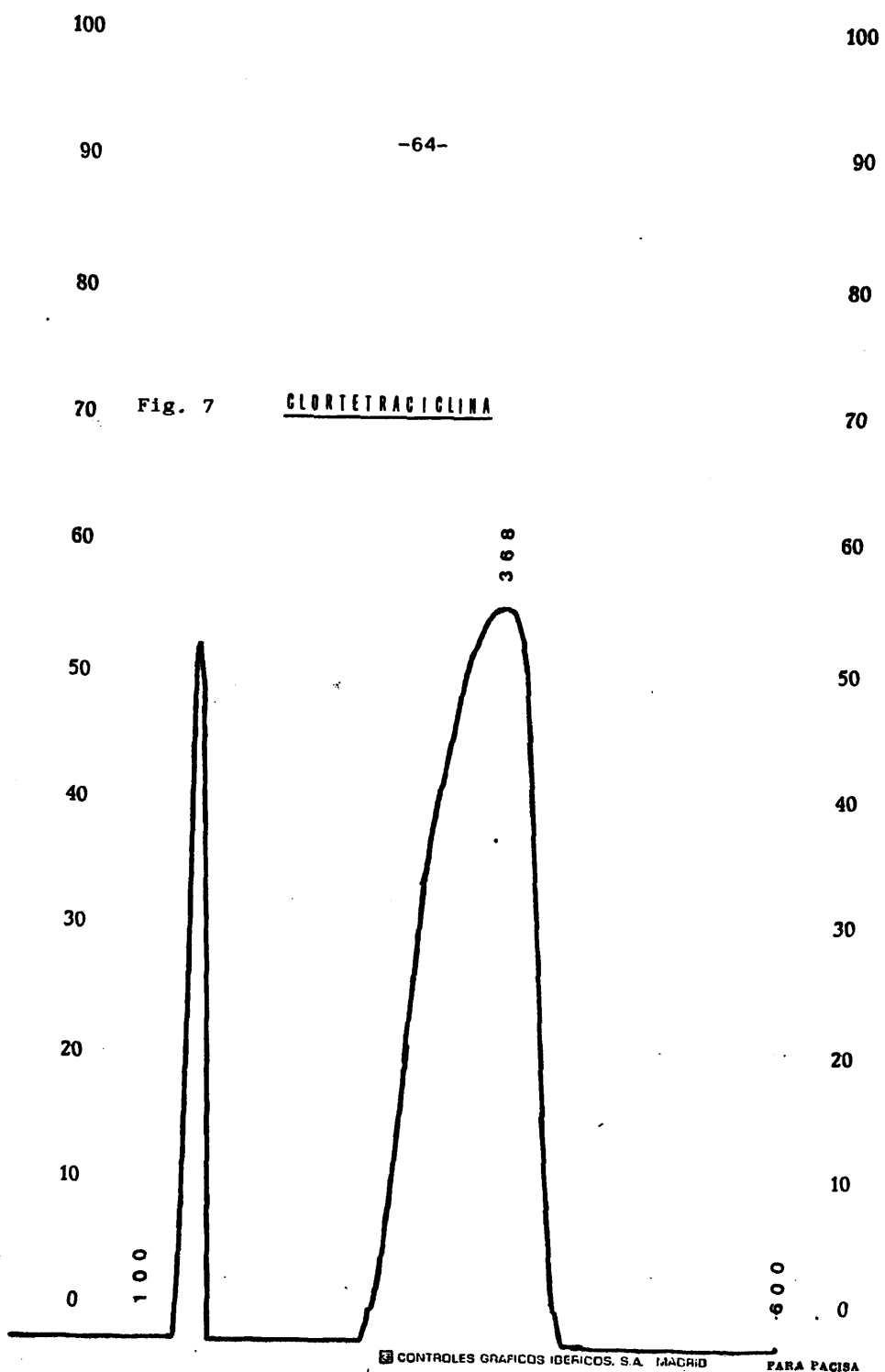
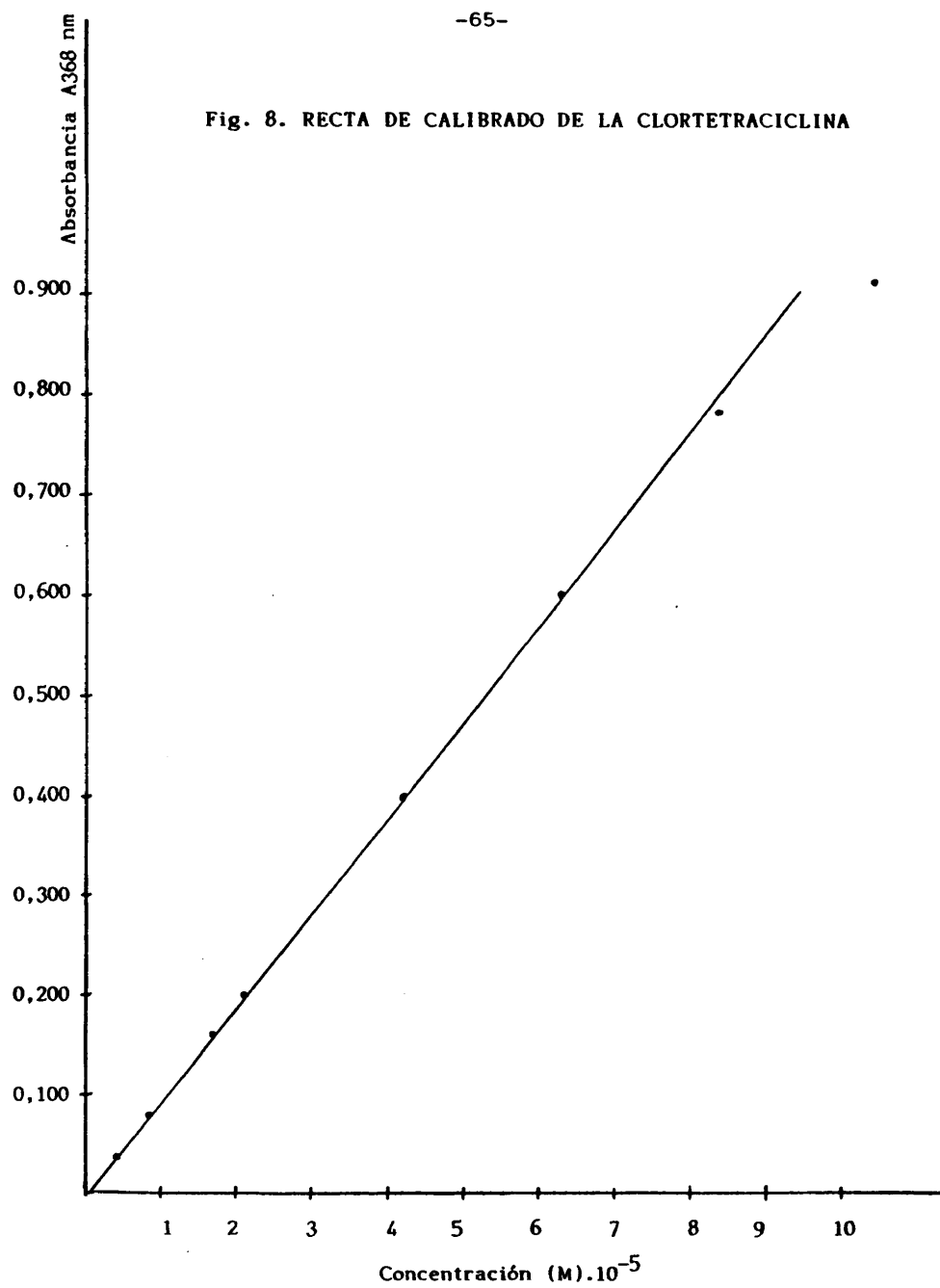


Fig. 8. RECTA DE CALIBRADO DE LA CLORTETRACICLINA



2.4.3. Determinación analítica de la demetilclortetraciclina.

La determinación analítica cuantitativa de la demetilclortetraciclina se realizó espectrofotométricamente en un espectrofotómetro Beckman Mod. 25.

Se estudia el espectro de dicho compuesto (Fig. 9) para determinar el máximo de absorción, quedando establecido a la longitud de onda de 370 nm a la luz visible.

Para la curva de calibrado se prepara una serie de concentraciones de la demetilclortetraciclina comprendidas entre $4,30 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ y $2,15 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ en solución acuosa. La lectura se realiza a 370 nm directamente en el espectrofotómetro, utilizándose agua como blanco.

Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en la Tabla IV y en la Fig. 10.

TABLA IV

Concentración (M)	Absorbancia a 370 nm
$4,30 \cdot 10^{-4}$	1,712
$1,72 \cdot 10^{-4}$	1,407
$1,29 \cdot 10^{-4}$	1,431
$1,08 \cdot 10^{-4}$	1,231
$8,60 \cdot 10^{-5}$	1,008
$6,45 \cdot 10^{-5}$	0,781
$4,30 \cdot 10^{-5}$	0,521
$2,15 \cdot 10^{-5}$	0,260
$1,29 \cdot 10^{-5}$	0,158
$8,60 \cdot 10^{-6}$	0,109
$4,30 \cdot 10^{-6}$	0,049
$2,15 \cdot 10^{-6}$	0,027

-67-

Fig. 9

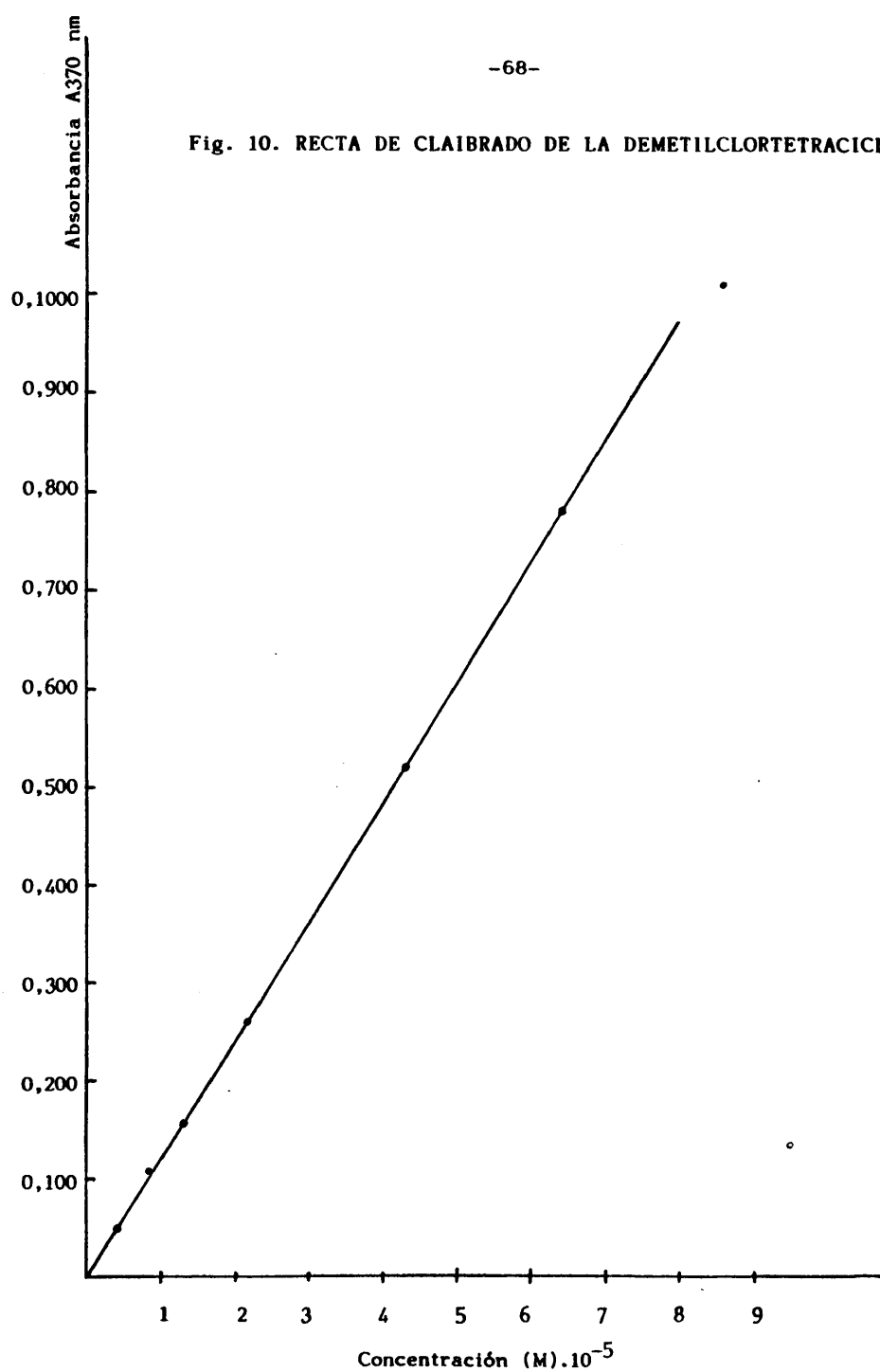
DEMÉTILCLORTETRACICLINA

370

100

600

Fig. 10. RECTA DE CLAIBRADO DE LA DEMETILCLORTETRACICLINA



2.4.4. Determinación analítica de la minociclina.

El análisis cuantitativo de este compuesto se obtuvo espectrofotométricamente en un espectrofotómetro Beckman Mod. 25.

Se realiza el espectro (Fig. 11) con el objeto de determinar el máximo de absorción, que en este caso resulta ser a la longitud de onda de 362 nm, visible, valor en el que mediremos las muestras de minociclina. Se utiliza como blanco, agua.

Para la curva de calibrado se preparan soluciones acuosas de minociclina a concentraciones comprendidas entre $2,19 \cdot 10^{-4} \text{M}$ y $4,38 \cdot 10^{-6} \text{M}$, leyendose directamente en el espectrofotómetro a 362 nm frente a agua.

Los resultados obtenidos se incluyen en la Tabla V y en la Fig. 12.

TABLA V

Concentración (M)	Absorbancia a 362 nm.
$2,19 \cdot 10^{-4}$	1,349
$8,75 \cdot 10^{-5}$	0,958
$6,57 \cdot 10^{-5}$	0,779
$4,38 \cdot 10^{-5}$	0,507
$3,50 \cdot 10^{-5}$	0,405
$2,63 \cdot 10^{-5}$	0,300
$2,19 \cdot 10^{-5}$	0,242
$1,75 \cdot 10^{-5}$	0,198
$8,75 \cdot 10^{-6}$	0,093
$4,38 \cdot 10^{-6}$	0,035

100

90

-70-

80

Fig. 11 NINOCICLINA

70

3 6 2

60

50

40

30

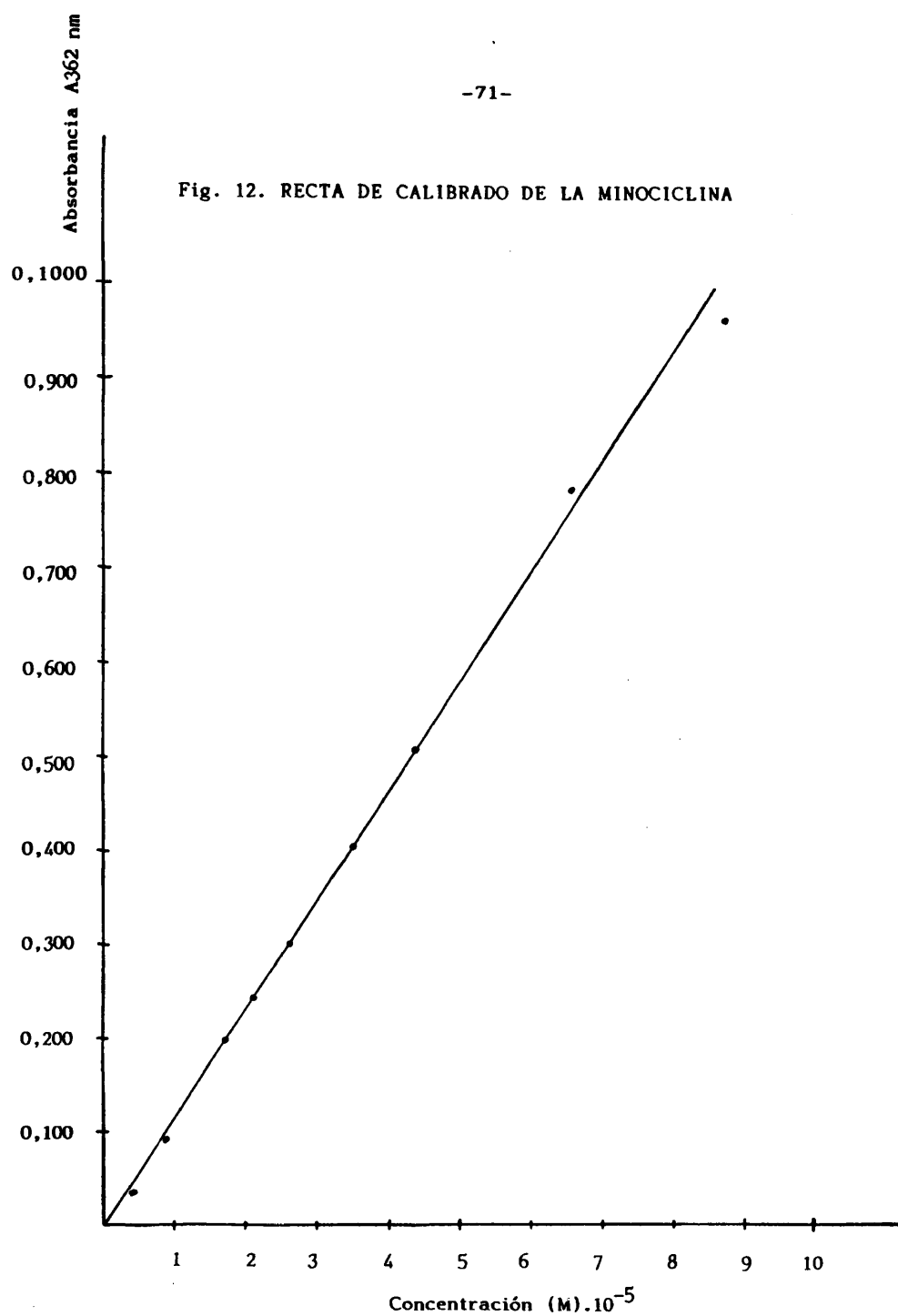
20

10

1 0 0

6 0 0

Fig. 12. RECTA DE CALIBRADO DE LA MINOCICLINA



2.4.5. Determinación analítica de la oxitetraciclina.

La determinación analítica cuantitativa de la oxitetraciclina se ha valorado espectrofotométricamente en un espectrofotómetro Beckman Mod. 25.

Se realiza el espectro (Fig. 13) para determinar el valor de máxima absorción, que será el elegido para las medidas del referido compuesto. El máximo de absorción seleccionado fue a la longitud de onda de 365 nm.

Para la curva de calibrado se preparan soluciones acuosas de oxitetraciclina a concentraciones comprendidas entre $1,09 \cdot 10^{-4} \text{M}$ y $2,1 \cdot 10^{-6} \text{M}$, leyendose la absorbancia directamente en el espectrofotómetro a 365 nm frente a agua.

Los resultados obtenidos están incluidos en la Tabla VI y en la Fig. 14.

TABLA VI

Concentración (M)	Absorbancia a 365 nm.
$1,09 \cdot 10^{-4}$	1,402
$8,69 \cdot 10^{-5}$	1,104
$6,52 \cdot 10^{-5}$	0,850
$4,34 \cdot 10^{-5}$	0,565
$2,17 \cdot 10^{-5}$	0,283
$1,73 \cdot 10^{-5}$	0,217
$1,08 \cdot 10^{-5}$	0,128
$2,11 \cdot 10^{-6}$	0,028

-73-

Fig. 13

OXITETRACICLINA

129

365

100

90

80

70

60

50

0

3

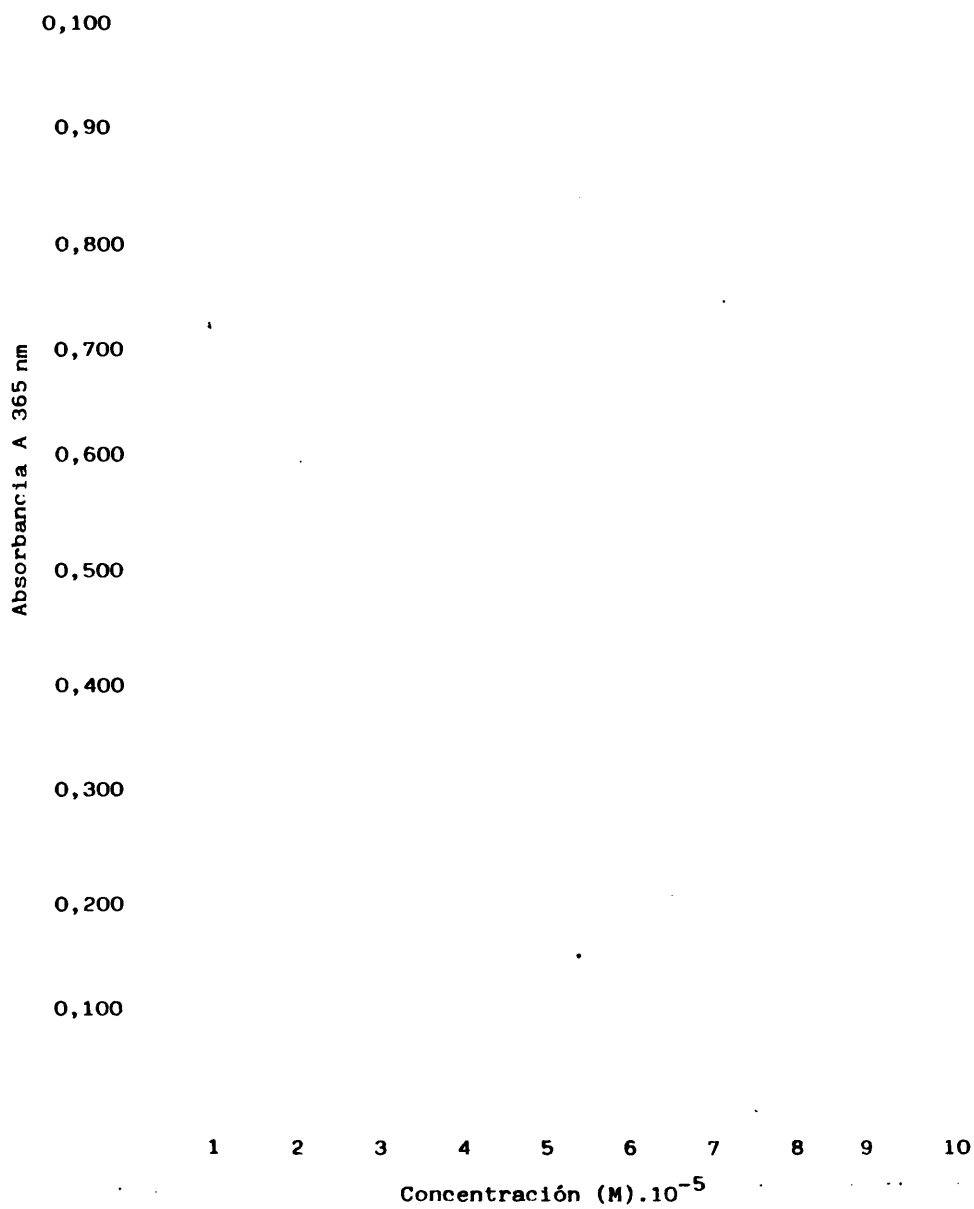
2

10

0

-600

Fig. 14.- RECTA DE CALIBRADO DE LA
OXITETRACICLINA



2.4.6. Determinación analítica de la tetraciclina.

La determinación analítica cuantitativa se realiza espectrofotométricamente en un espectrofotómetro Beckman Mod. 25.

El valor máximo de absorción se selecciona tras realizar su espectro (Fig. 15) obteniéndose el máximo de absorción a la longitud de onda de 374 nm a la luz visible.

Para la curva de calibrado se preparan soluciones acuosas de tetraciclina a concentraciones comprendidas entre $2,25 \cdot 10^{-4}$ M y $4,50 \cdot 10^{-6}$ M.

Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en la Tabla VII y en la Fig. 16.

TABLA VII

Concentración (M)	Absorbancia a 374 nm
$2,25 \cdot 10^{-4}$	1,389
$9,01 \cdot 10^{-5}$	0,991
$6,75 \cdot 10^{-5}$	0,778
$5,40 \cdot 10^{-5}$	0,686
$4,50 \cdot 10^{-5}$	0,577
$2,25 \cdot 10^{-5}$	0,276
$3,60 \cdot 10^{-5}$	0,435
$1,80 \cdot 10^{-5}$	0,221
$9,01 \cdot 10^{-6}$	0,114
$4,51 \cdot 10^{-6}$	0,056

100

90

-76-

80

Fig. 15

TETRACICLINA

70

60

374

50

40

30

20

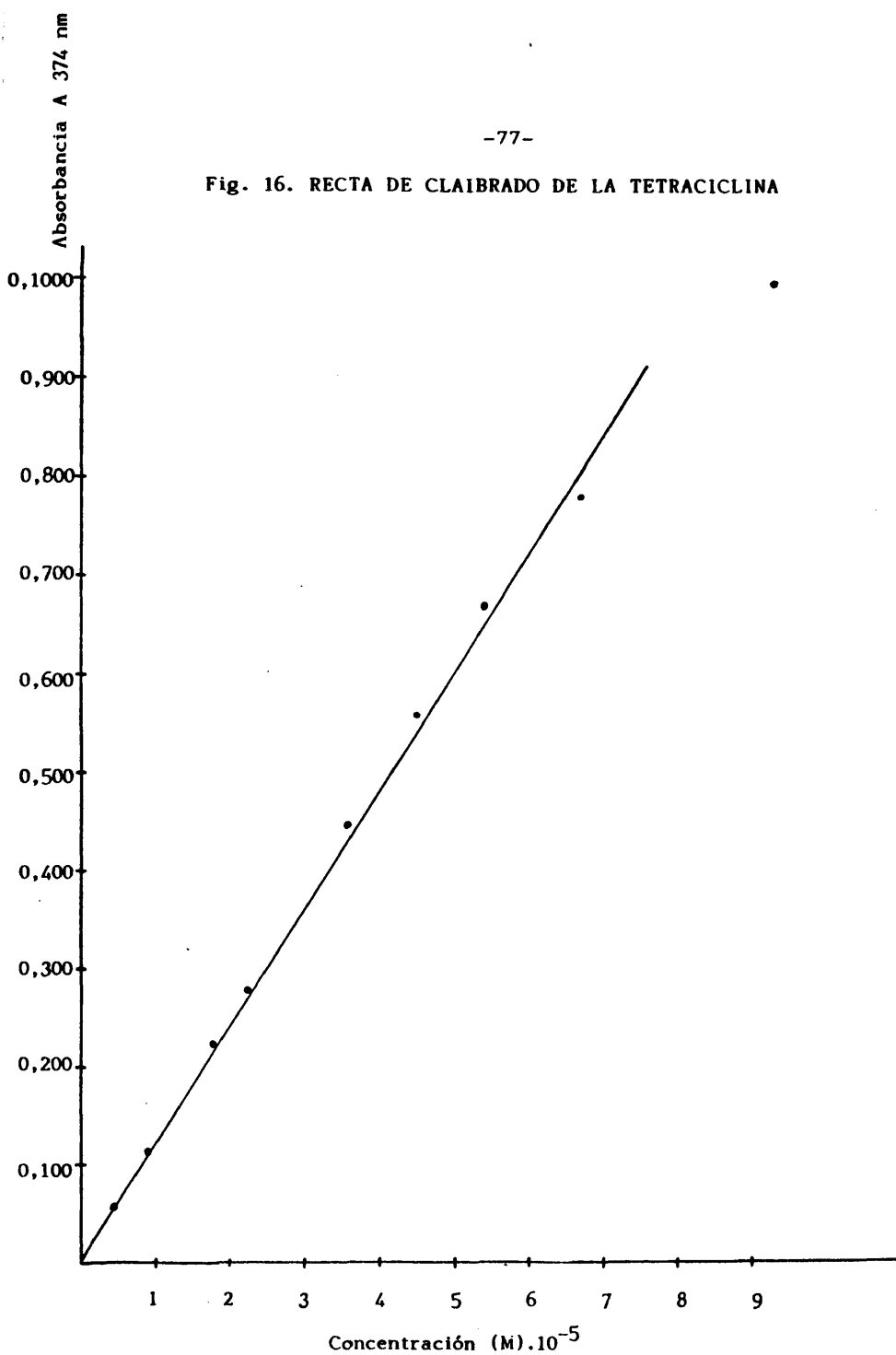
10

100

0

600

Fig. 16. RECTA DE CLAIBRADO DE LA TETRACICLINA



2.5. Determinación analítica del 1-propranolol-³H.

2.5.1. Conservación de la actividad óptica del propranolol después del marcaje isotópico.

El isomero *levo* del clorhidrato de propranolol fue marcado isotópicamente con trítio por medio de una reacción catalítica de intercambio de hidrogeniones, en la Junta de Energía Nuclear de Madrid.

Para comprobar si en el proceso se perdía la isomería óptica del compuesto se reprodujeron las condiciones en las que tuvo lugar dicho marcaje para proceder a observar la desviación del haz de luz polarizada por polarimetría óptica.

El procedimiento es el siguiente: se dispuso de cuatro ampollas de vidrio que contenían cada una 480 mg. de 1-propranolol, 2,4 ml. de ácido acético al 5% y 480 mg. de carbón activado con paladio al 10%, cerradas a la llama y en baño a 65°C durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se filtra el contenido de las ampollas sobre papel de filtro. El filtrado se extrajo con cloroformo, y después de la evaporación del disolvente, se observó en célula de polarímetro de un decímetro de longitud y 5 cm³ de capacidad una cantidad total de 1,44 g. de una solución acuosa de 1-propranolol extraído, dando una desviación del haz de luz que indica no existe pérdida apreciable de la isomería óptica.

La cromatografía en capa fina del 1-propranolol sobre cromatoplaaca de silice gel, con un sistema de desarrollo metanol: amoníaco (110:1,5), frente a un patrón, mostró un Rf de 0,45, y una sola mancha idéntica a la del patrón lo cual indica que no hubo alteraciones estructurales de la molécula en los procesos de marcaje.

2.5.2. Determinación de la purificación del 1-propranolol-³H de las posibles sustancias de radiolisis.

Se toma la solución de 1-propranolol-³H, se alcaliniza con NaOH 0,1N y se añade cloroformo. A continuación se agita la mezcla en embudo de decantación y se extrae la fase inferior o de cloroformo, evaporandose a sequedad. El extracto seco se disuelve con cloroformo y se puntea en cromatoplaacas de silicagel previamente activadas en estufa a 90°C durante media hora.

Como sistema de desarrollo se utiliza metanol-amoniaco (100:1,5). El revelado a la luz ultravioleta muestra la mancha de 1-propranolol, con Rf idéntico al del patrón. Se separa por rascado la mancha correspondiente, se eluye con etanol y se centrifuga. La solución alcoholica obtenida se somete a evaporación a sequedad y el extracto se redissuelve en un volumen apropiado de agua, para nuestras posteriores experiencias.

2.5.3. Determinación radiométrica del 1-propranolol-³H.

Preparación de las muestras para conteo radiactivo. En el estudio de unión a proteínas por el método de precipitación con ClO_4H (ver material y métodos 2.2.), una vez realizada la precipitación de la fracción de proteína libre con ácido perclórico y tras la centrifugación se toman muestras de 0,1 ml. de la fracción sobrenadante. A estas muestras de 0,1 ml. se les adiciona 0,3 ml. de isopropanol para una mejor clarificación del medio y 2 ml. de líquido de centelleo PCS con posterior agitación obteniéndose un medio homogéneo, transparente y óptimo para su conteo radiactivo.

Los miniviales o minitubos así preparados se introducen tapados en viales tipo standard. Estos viales utilizados para el conteo de la radioactividad fueron de borosilicato de pequeño contenido de potasio (bajo fondo radiactivo), todos ellos iguales con una capacidad de 20 ml. El conteo de la radioactividad fue realizado en un espectrómetro de centelleo líquido (Intertechnique, Mod. SL3000) bajo las condiciones siguientes: ventana prefijada para canal de trítio, tiempo de conteo hasta un máximo de 20 minutos con interrupción automática del mismo cuando la desviación típica del conteo sea inferior a un 0,2% de las cuentas totales. No se realizó estudios de extinción en nuestras muestras por considerarlo innecesario, toda vez que contenían idéntica cantidad de centelleo líquido y agentes extintores por lo que todas ellas deberían

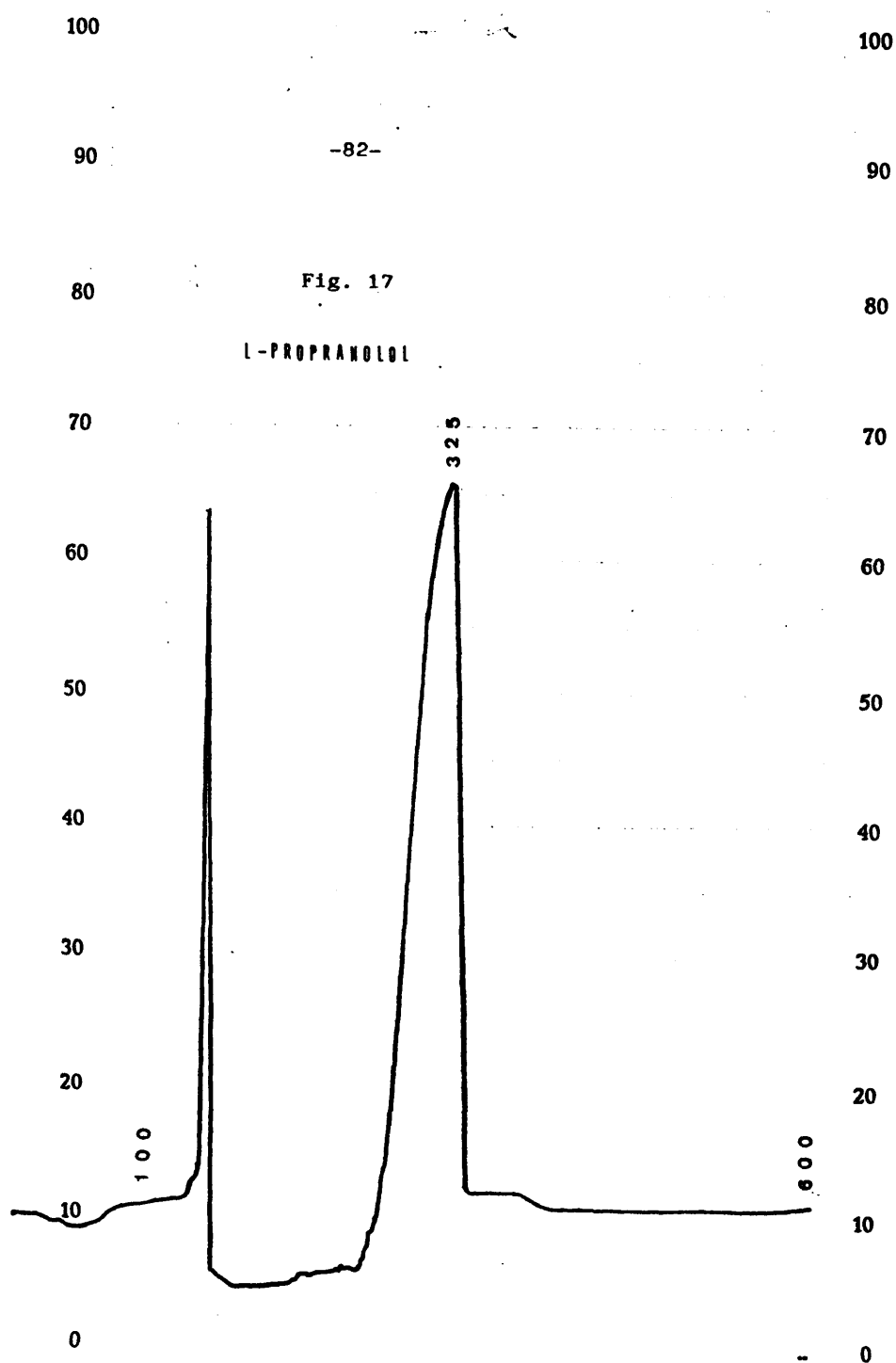
tener idéntica extinción. Por lo tanto esta metodología nos permite establecer la relación del fármaco no unido a proteínas plasmáticas respecto al fármaco total a estudio añadido a partir de las cuentas por minuto obtenidas en el espectrómetro de centelleo líquido sin necesidad de calcular las desintegraciones por minuto.

2.6. Determinación analítica en los estudios de interacción fármaco-proteinopexia.

En los estudios de interacción de la quinidina y del 1-propranolol-³H frente a la unión de las tetraciclinas a la seroalbúmina bovina y de las tetraciclinas frente a la unión de la quinidina y 1-propranolol-³H, la metodología seguida es la misma indicada en el apartado 2.1.

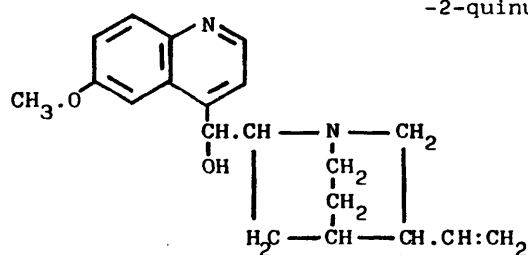
Una vez obtenido el filtrado para la determinación analítica cuantitativa de la fracción del fármaco no unido a la seroalbúmina bovina, se realiza una previa extracción del fármaco a valorar antes de proceder a su análisis espectrofotométrico ó espectrofluorimétrico.

Para el caso de la quinidina con las tetraciclinas se realiza la separación en medio alcalino con cloroformo. Similarmente para el caso del 1-propranolol-³H con las tetraciclinas también se realizó la separación en medio alcalino con cloroformo, a pesar de que el espectro el máximo de absorción en visible de las tetraciclinas estudiadas no parece interaccionar con el máximo de absorción en visible del propranolol (Fig. 17).

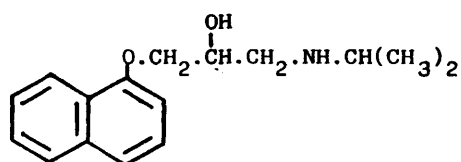


2.7. Fármacos y reactivos utilizados.

- Quinidina ($C_{20}H_{24}N_2O_2$, $2H_2O$) (PM = 360,5) 6-Metoxi- -(5-vinil-
-2-quinuclidinil)-4-quinolinemetanol.

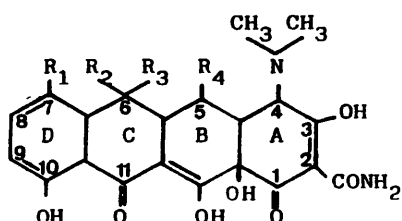


- Propranolol (1-isopropilamino-3-(naftil-1-oxi)propranol-2) ($C_{16}H_{21}NO_2$)
(PM = 259,4)



- Tetraciclinas.

Se ha estudiado la serie de tetraciclinas: clortetraciclina, demetilclortetraciclina, minociclina, oxitetraciclina y tetraciclina.



- (4-dimetilamino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-3-10-12-12a-tetrahidroxi-1,11-dioxonaftaceno-2-carboxamida.

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
clortetraciclina	Cl	CH ₃	OH	H
demetilclortetraciclina	Cl	H	OH	H
minociclina	N(CH ₃) ₂ H		H	H
oxitetraciclina	H	CH ₃	OH	OH
tetraciclina	H	CH ₃	OH	H

clortetraciclina (C₂₂H₂₃ClN₂O₈) PM = 478,9

demetilclortetraciclina (C₂₁H₂₁ClN₂O₈) PM = 464,9

minociclina (C₂₃H₂₇O₇N₃) PM = 457

oxitetraciclina (C₂₂H₂₄N₂O₉) PM = 460,5

tetraciclina (C₂₂H₂₄N₂O₈) PM = 444,4

Todos los fármacos estudiados se utilizaron en forma de clorhidrato y fueron suministrados por las casas comerciales:

- quinidina
- propranolol (sigma)
- clortetraciclina (sigma)
- demetilclortetraciclina (Lederle)
- minociclina (Cyanamid)
- oxitetraciclina (Pfizer)
- tetraciclina (Sigma)
- albúmina bovina (Sigma). Libre de ácidos grasos.
- ácido acético al 5% (CH₃-COOH) (Merck)
- ácido perclórico (ClO₄H) (Merck)
- ácido sulfúrico 0,1 N (SO₄H₂) (Merck)
- amoníaco (NH₃) (Merck)
- benceno (C₆H₆) (Merck)

- Buffer fosfato pH=7,4 preparado a partir de las soluciones stock:
 - A: solución de fosfato sódico monobásico (0,2M) (27,8g. de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ (Merck) en 1 l. de agua destilada y desionizada).
 - B: solución de fosfato sódico dibásico (0,2M) (53,65g. de $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck) ó 71,7g. de $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck) en 1 l. de agua destilada y desionizada).

El buffer fosfato pH=7,4 fue preparado a partir de 19 ml de solución A, 81 ml. de solución B, diluido todo ello en un total de 200 ml. (150).

- Carbon activado (Merck)
- Cloroformo (Cl_3CH)
- Cromatoplasmas de sílice gel 60 F₂₅₄ (Merck)
- Etanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$) (Merck)
- Hidroxido sódico 0,1M (NaOH) (Merck)
- Líquido de centelleo PCS (Amersham)
- Membranas Pellicon PSED (Millipore)
- Metanol (CH_3OH) (Merck)
- Nitrogeno (N_2) (SEO)
- Propranolol (2) ($\text{CH}_3\text{CH(OH)CH}_3$) (Merck)

86

RESULTADOS

3.1. Unión de la quinidina a la seroalbúmina bovina por ultrafiltración.

Se realizan las determinaciones de la unión de la quinidina a la seroalbúmina bovina por ultrafiltración. La determinación analítica de la quinidina se realizó por espectrofluorimetría estudiándose la unión de la quinidina a las concentraciones de:

- $5,50 \cdot 10^{-6} M$
- $1,38 \cdot 10^{-5} M$
- $2,21 \cdot 10^{-5} M$
- $2,77 \cdot 10^{-5} M$
- $4,16 \cdot 10^{-5} M$
- $5,54 \cdot 10^{-5} M$
- $8,32 \cdot 10^{-5} M$
- $11,00 \cdot 10^{-5} M$

a la seroalbúmina bovina. Los resultados se expresan en las Tablas VIII y IX y gráficas 18 y 19.

TABLA VIII.- UNION DE LA QUINIDINA A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión	Valor medio (\bar{U})	Desviación standard (DS)	Error standard de la me- dia ESM
5,50 . 10 ⁻⁶ M	80,00	79,00	2,22	0,79
	80,00			
	79,00			
	78,00			
	82,50			
	80,00			
	77,50			
	75,00			
1,38 . 10 ⁻⁵ M	77,17	71,57	6,70	2,38
	72,79			
	65,04			
	62,17			
	64,00			
	77,67			
	76,54			
	77,17			
2,21 . 10 ⁻⁵ M	72,76	69,75	3,00	1,06
	67,72			
	74,67			
	69,67			
	66,74			
	68,00			
	66,67			
	71,78			
2,77 . 10 ⁻⁵ M	66,75	68,88	2,81	1,00
	70,25			
	68,00			
	68,50			
	64,00			
	73,50			
	70,50			
	69,50			
4,16 . 10 ⁻⁵ M	65,33	66,45	3,58	1,27
	62,67			
	67,48			
	74,00			
	67,33			
	65,42			
	62,67			
	66,67			

Continuación TABLA VIII

Concentración	% Unión	Valor medio (\bar{U})	Desviación standard (DS)	Error standard de la me- dia (ESM)
5,45 . 10 ⁻⁵ M	72,00	65,40	2,16	0,77
	66,50			
	68,00			
	67,50			
	64,08			
	62,50			
	62,50			
	65,40			
8,32 . 10 ⁻⁵ M	65,31	64,25	2,59	0,92
	66,00			
	66,28			
	62,22			
	60,00			
	63,19			
	63,00			
	63,00			
11,00 . 10 ⁻⁵ M	62,00	63,01	0,77	0,27
	63,10			
	63,08			
	64,05			
	61,98			
	62,92			
	62,91			
	64,04			

La representación gráfica de esta tabla viene dada en la figura 18. Los resultados señalan que el mayor porcentaje de unión de la quinidina a la seroalbúmina bovina se alcanza a la concentración de $5,50 \cdot 10^{-6}$ M.

TABLA IX.- UNION DE LA QUINIDINA A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión	r	M	r/M .10 ³
5,50 . 10 ⁻⁶ M	79,00	0,0063515	0,0000011	5,774
1,38 . 10 ⁻⁵ M	71,57	0,0146233	0,0000039	3,750
2,21 . 10 ⁻⁵ M	69,75	0,0227474	0,0000067	3,395
2,77 . 10 ⁻⁵ M	68,88	0,0282127	0,0000086	3,281
4,16 . 10 ⁻⁵ M	66,45	0,0407680	0,0000139	2,933
5,54 . 10 ⁻⁵ M	65,40	0,0534711	0,0000191	2,800
8,32 . 10 ⁻⁵ M	64,25	0,0788774	0,0000297	2,656
11,00 . 10 ⁻⁵ M	63,01	0,1023633	0,0000406	2,521

siendo:

r : relación entre moles de fármaco unido a seroalbúmina bovina
y moles totales de proteína.

M : concentración del medicamento libre.

La representación gráfica de esta Tabla (Fig. 19) indica que al menos existen dos clases de sitios de unión. Las constantes de asociación (K_1, K_2) y el número de sitios de unión (N_1, N_2) para cada clase son:

$$\begin{aligned} K_1 &= 4,9 \cdot 10^4 & N_1 &= 0,050 \\ K_2 &= 5,7 \cdot 10^3 & N_2 &= 0,5 \end{aligned}$$

Las ecuaciones de las respectivas rectas de regresión lineal (y_1, y_2) y los coeficientes de correlación (r_1, r_2) vienen expresadas en la Fig. 19.

Fig. 18.- UNION DE LA QUINIDINA A LA SEROALBUMINA BOVINA.

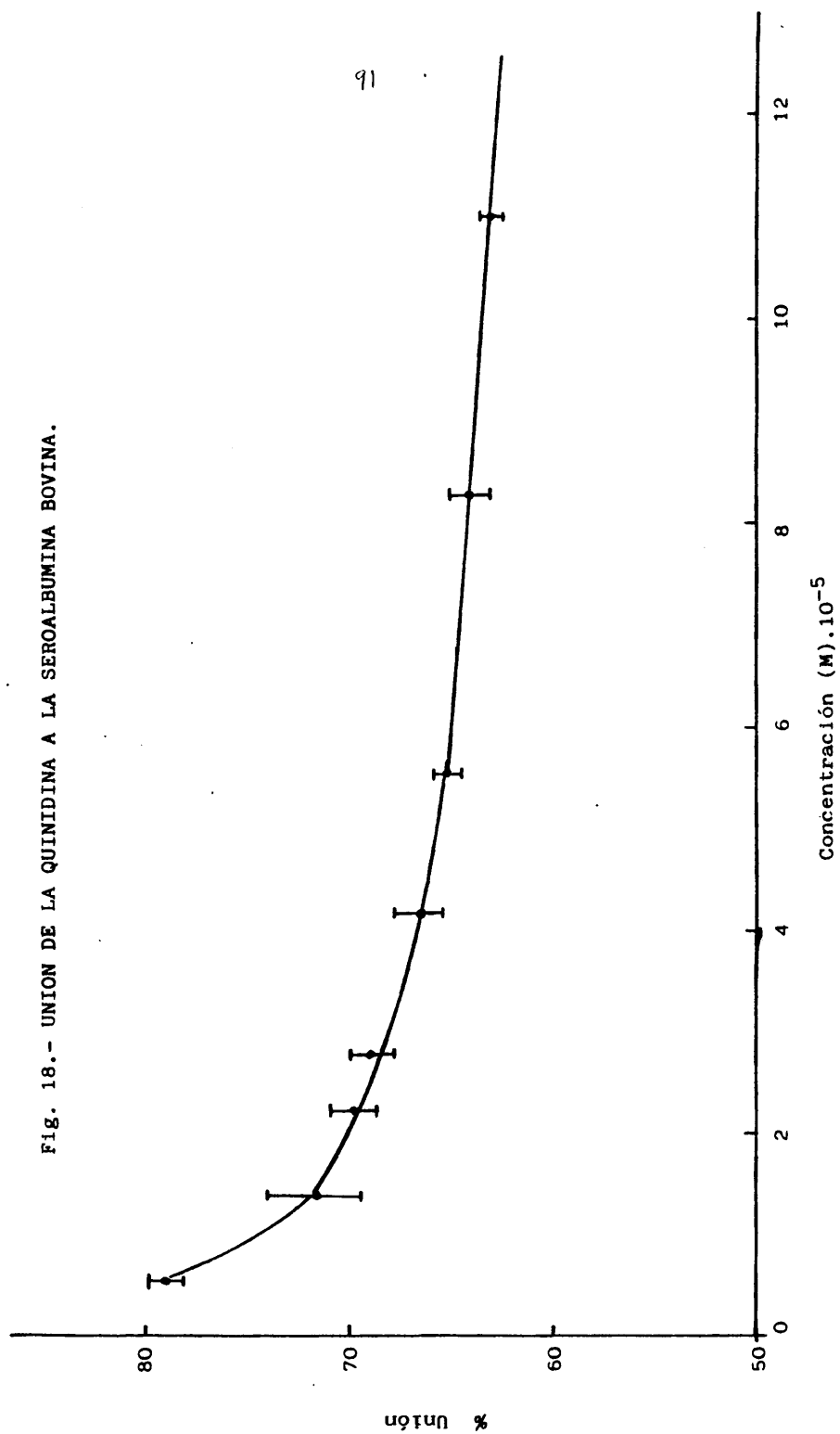
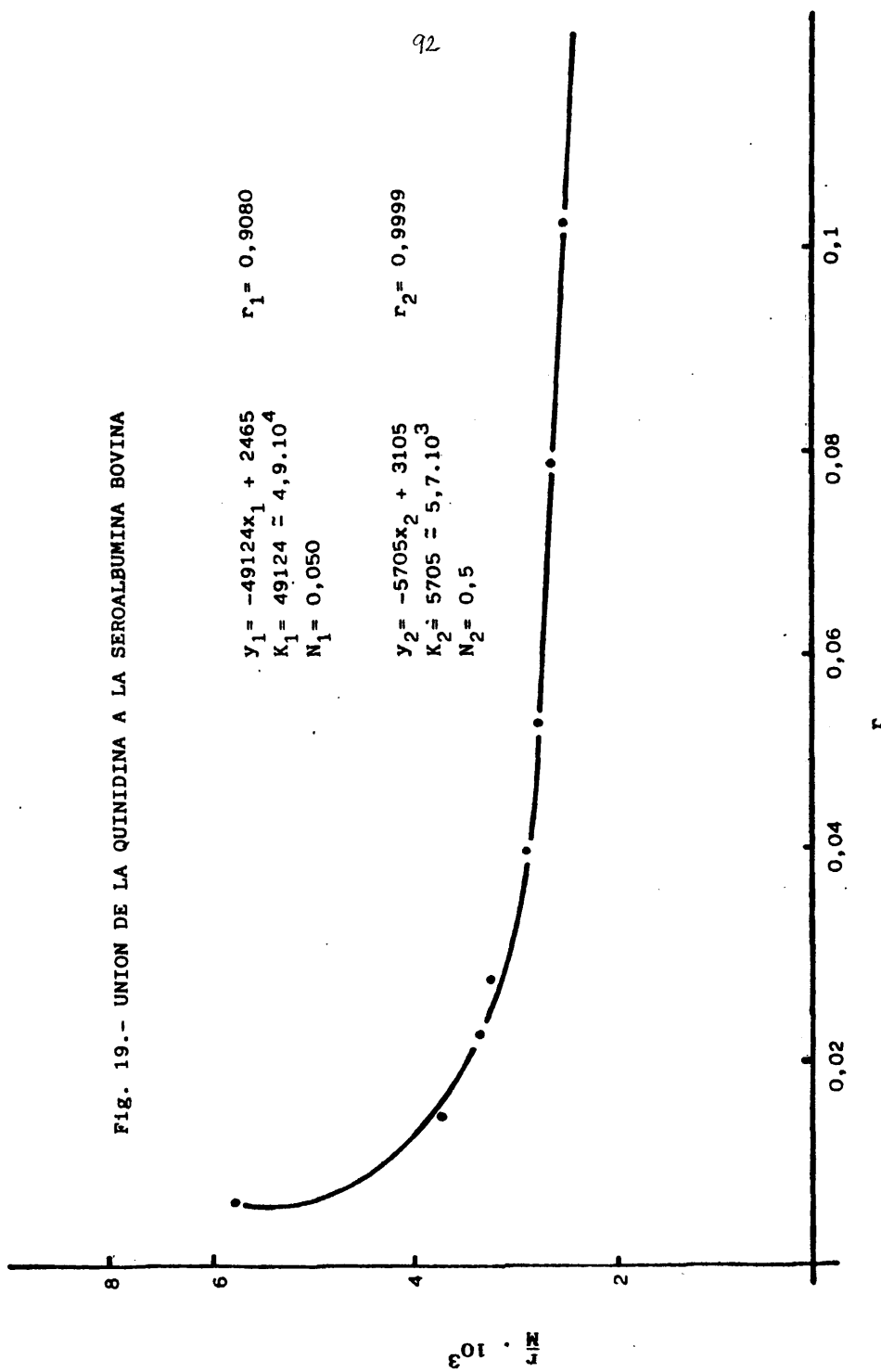


Fig. 19.- UNION DE LA QUINIDINA A LA SEROALBUMINA BOVINA



3.2. Unión de una serie de tetraciclinas a la seroalbúmina bovina por ultrafiltración.

Se realiza un estudio sobre la unión a la seroalbúmina bovina de una serie de tetraciclinas:

a) clortetraciclina a las concentraciones de:

- $1,04 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- $1,67 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- $2,08 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- $2,29 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- $2,71 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- $3,13 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- $3,75 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- $6,26 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- $8,35 \cdot 10^{-4} \text{M}$

Los resultados se expresan en las Tablas X y XI y gráficas 20 y 21.

b) demetilclortetraciclina a las concentraciones de:

- $2,36 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- $2,58 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- $2,79 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- $3,22 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- $4,30 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- $5,37 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- $8,60 \cdot 10^{-4} \text{M}$

Los resultados se expresan en las Tablas XII y XIII y gráficas 22 y 23.

c) minociclina a las concentraciones de:

- $2,40 \cdot 10^{-4}M$
- $2,84 \cdot 10^{-4}M$
- $3,28 \cdot 10^{-4}M$
- $3,93 \cdot 10^{-4}M$
- $4,37 \cdot 10^{-4}M$
- $8,75 \cdot 10^{-4}M$

Los resultados se expresan en las Tablas XIV y XV y gráficas 24 y 25.

d) oxitetraciclina a las concentraciones de:

- $2,39 \cdot 10^{-4}M$ - $4,98 \cdot 10^{-4}M$
- $2,61 \cdot 10^{-4}M$ - $5,80 \cdot 10^{-4}M$
- $2,94 \cdot 10^{-4}M$
- $3,26 \cdot 10^{-4}M$
- $3,80 \cdot 10^{-4}M$
- $4,35 \cdot 10^{-4}M$

Los resultados se expresan en las Tablas XVI y XVII y gráficas 26 y 27.

e) tetraciclina a las concentraciones de:

- $1,80 \cdot 10^{-4}M$
- $2,25 \cdot 10^{-4}M$
- $2,47 \cdot 10^{-4}M$
- $3,37 \cdot 10^{-4}M$
- $6,75 \cdot 10^{-4}M$
- $9 \cdot 10^{-4}M$

Los resultados se expresan en las Tablas XVIII y XIX y gráficas 28 y 29.

TABLA X .- UNION DE LA CLORTETRACICILINA A LA SEROALBUMINA BOVINA

Concentración	% Unión	Valor medio (\bar{U})	Desviación standard (DS)	Error standard de la media (ESM)
1,04 . 10 ⁻⁴ M	89,14	91,02	1,17	0,41
	92,00			
	92,00			
	90,00			
	92,05			
	89,99			
	91,02			
1,67 . 10 ⁻⁴ M	94,81	94,25	0,41	0,15
	94,06			
	94,81			
	94,06			
	94,31			
	94,06			
	94,31			
2,08 . 10 ⁻⁴ M	93,00	92,95	0,30	0,11
	93,63			
	92,81			
	91,91			
	92,63			
	92,99			
	92,73			
2,29 . 10 ⁻⁴ M	92,90	92,62	0,48	0,17
	92,70			
	92,00			
	93,50			
	92,54			
	92,54			
	92,00			
	93,00			
	92,68			

Continuación TABLA X

Concentración	% Unión	Valor medio (\bar{U})	Desviación standard (DS)	Error standard de la media (ESM)
2,71 . 10 ⁻⁴ M	91,96	92,50	0,52	0,18
	92,00			
	92,59			
	92,41			
	92,57			
	93,43			
	92,00			
	93,04			
3,13 . 10 ⁻⁴ M	91,77	92,32	0,28	0,10
	92,66			
	92,26			
	92,32			
	92,66			
	92,28			
	92,38			
	92,29			
3,75 . 10 ⁻⁴ M	91,87	92,12	0,17	0,06
	92,44			
	92,18			
	92,08			
	92,16			
	92,08			
	92,05			
	92,09			
6,26 . 10 ⁻⁴ M	92,00	92,10	0,31	0,11
	92,50			
	92,05			
	92,06			
	92,50			
	92,14			
	91,50			
	92,05			
8,35 . 10 ⁻⁴ M	91,72	91,85	0,43	0,15
	91,11			
	92,72			
	91,90			
	91,80			
	91,78			
	91,92			
	91,85			

La representación gráfica de esta Tabla viene dada en la Fig. 20.

Los resultados señalan que el mayor porcentaje de unión de la clortetraciclina a la seroalbúmina bovina se alcanza a la concentración de $1,67 \cdot 10^{-4}M$.

TABLA XI .- UNION DE LA CLORTETRACICLINA A LA SEROALBUMINA BOVINA

Concentración	% Unión	r	M	r/M . 10 ³
1,67 . 10 ⁻⁴ M	94,25	0,2325619	0,0000096	24,225
2,08 . 10 ⁻⁴ M	92,95	0,2866921	0,0000147	19,503
2,29 . 10 ⁻⁴ M	92,62	0,3142417	0,0000169	18,594
2,71 . 10 ⁻⁴ M	92,50	0,3708955	0,0000203	18,271
3,13 . 10 ⁻⁴ M	92,33	0,4271698	0,0000240	17,799
3,75 . 10 ⁻⁴ M	92,12	0,5114379	0,0000296	17,278
6,26 . 10 ⁻⁴ M	92,10	0,8522114	0,0000494	17,251
8,35 . 10 ⁻⁴ M	91,85	1,1362819	0,0000659	17,243

siendo:

r : relación entre moles de fármaco unido a seroalbúmina bovina
y moles totales de proteína.

M : concentración del medicamento libre.

La representación gráfica de esta Tabla (Fig. 21) indica que al menos existen dos clases de sitios de unión. Las constantes de asociación ($K_1; K_2$) y el número de sitios de unión ($N_1; N_2$) para cada clase son:

$$\begin{aligned} K_1 &= 9,80 \cdot 10^3 & N_1 &= 2,26 \\ K_2 &= 56 & N_2 &= 304,20 \end{aligned}$$

Las ecuaciones de las respectivas rectas de regresión lineal (y_1, y_2) y los coeficientes de correlación (r_1, r_2) vienen expresadas en la Fig. 21.

Fig. 20.- UNION DE LA CLORTETRACICLINA A LA SEROALBUMINA BOVINA

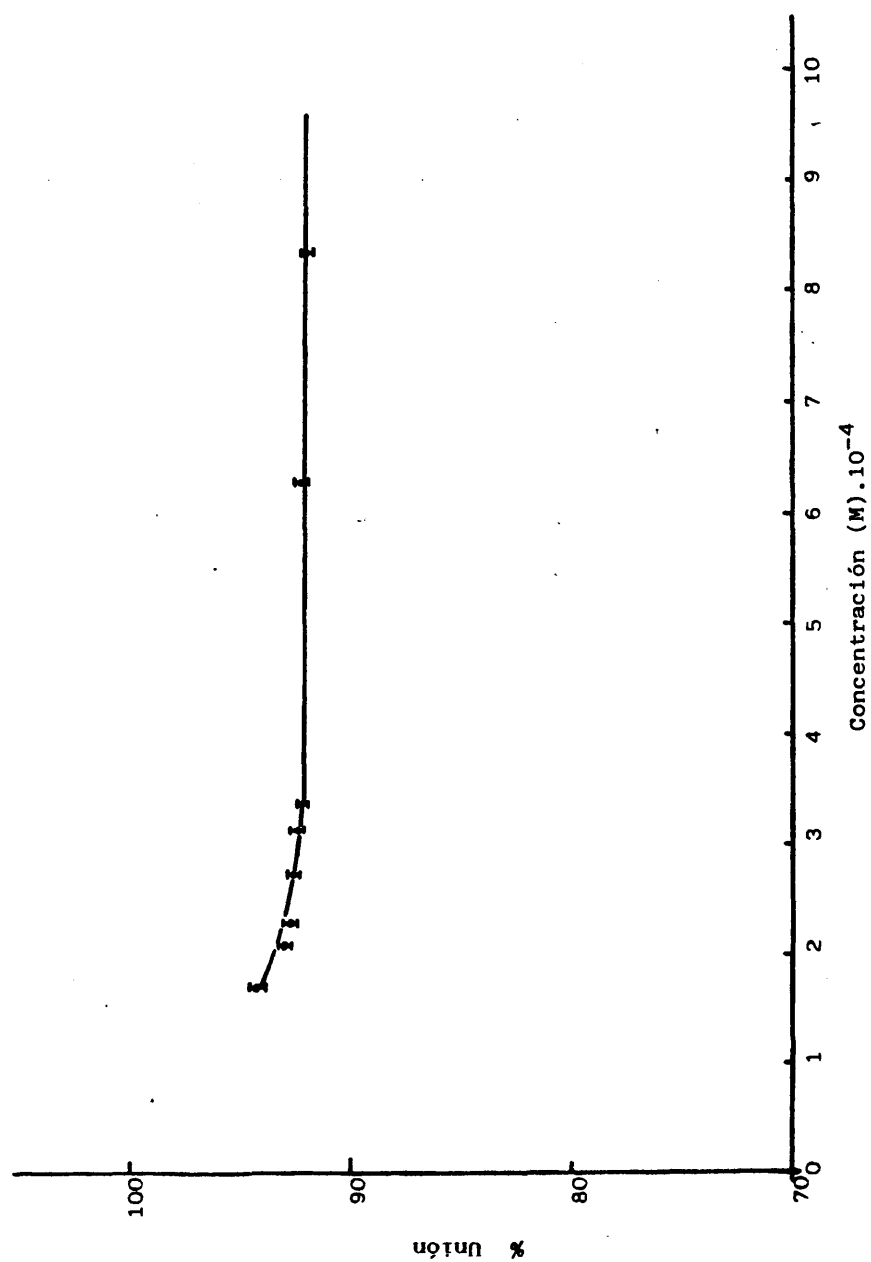


Fig. 21.- UNION DE LA CLORTETRACICLINA A LA SEROALBUMINA BOVINA

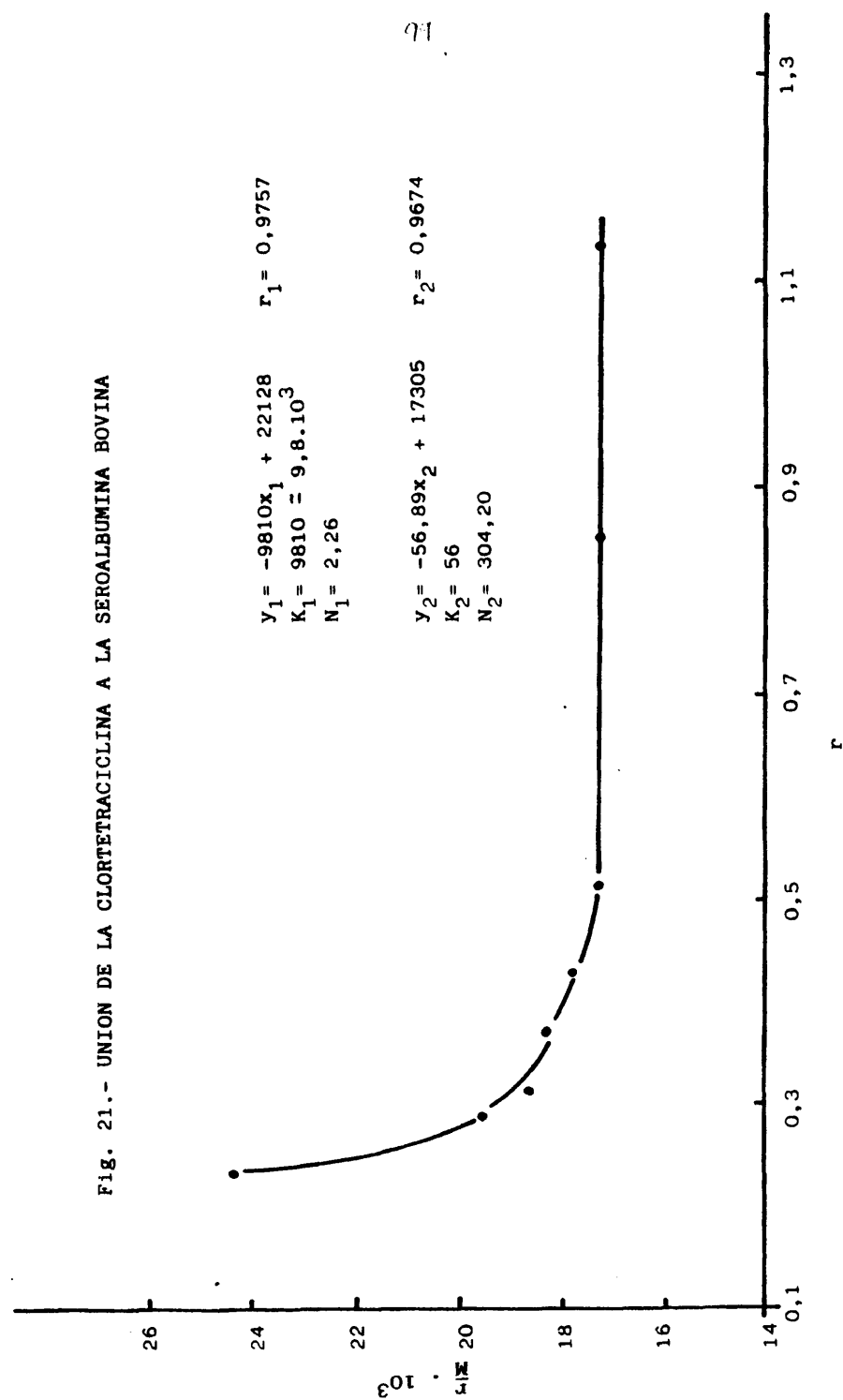


TABLA XII .- UNION DE LA DEMETILCLORTETRACICLINA A LA SEROALBUMINA BOVINA

Concentración	% Unión	Valor medio (\bar{U})	Desviación standard (DS)	Error standard de la media (ESM)
2,36 . 10 ⁻⁴ M	89,09	89,54	0,41	0,15
	90,40			
	89,09			
	89,63			
	89,45			
	89,51			
	89,57			
2,58 . 10 ⁻⁴ M	89,59	85,36	0,78	0,28
	85,86			
	84,38			
	85,33			
	86,32			
	84,40			
	86,38			
2,79 . 10 ⁻⁴ M	84,82	85,24	0,14	0,05
	85,39			
	85,20			
	85,40			
	85,25			
	85,30			
	85,27			
3,22 . 10 ⁻⁴ M	85,23	81,20	0,42	0,15
	84,94			
	85,40			
	81,25			
	80,50			
	81,09			
	81,26			
	80,91			
	81,14			
	81,95			
	81,50			

Continuación TABLA XII

Concentración	% Unión	Valor medio (\bar{U})	Desviación standard (DS)	Error standard de la media (ESM)
4,30 . 10 ⁻⁴ M	77,01	77,05	0,83	0,29
	77,50			
	77,12			
	77,25			
	77,09			
	75,25			
	76,98			
	78,20			
5,37 . 10 ⁻⁴ M	75,20	76,00	0,68	0,24
	75,98			
	76,98			
	76,80			
	76,07			
	76,05			
	74,97			
	75,95			
8,60 . 10 ⁻⁴ M	71,18	72,22	0,57	0,20
	72,50			
	72,16			
	73,26			
	71,94			
	72,15			
	72,28			
	72,29			

La representación grafica de esta Tabla viene dada en la Fig. 22.

Los resultados señalan que el mayor porcentaje de unión de la demetilclortetraciclina a la seroalbúmina bovina se alcanza a la concentración de $2,36 \cdot 10^{-4}$ M concentración elegida para los estudios posteriores de interacción.

TABLA XIII.- UNION DE LA DEMETILCLORTETRACICLINA A LA SEROALBUMINA BOVINA

Concentración	% Unión	r	M	$r/M \cdot 10^3$
$2,36 \cdot 10^{-4} M$	89,54	0,3128508	0,0000247	12,666
$2,58 \cdot 10^{-4} M$	85,36	0,3254062	0,0000377	8,631
$2,79 \cdot 10^{-4} M$	85,24	0,351994	0,0000412	8,544
$3,22 \cdot 10^{-4} M$	81,20	0,3868537	0,0000606	6,384
$4,30 \cdot 10^{-4} M$	77,05	0,4895125	0,0000987	4,960
$5,37 \cdot 10^{-4} M$	76,00	0,6035450	0,0001290	4,679
$8,60 \cdot 10^{-4} M$	72,22	0,9177252	0,0002390	3,840

siendo:

r : relación entre moles de fármaco unido a seroalbúmina bovina y moles totales de proteína.

M : concentración del medicamento libre.

La representación gráfica de esta Tabla (Fig. 23) indica que al menos existen dos clases de sitios de unión. Las constantes de asociación ($K_1; K_2$) y el número de sitios de unión ($N_1; N_2$) para cada clase son:

$$K_1 = 4,20 \cdot 10^4 \quad N_1 = 0,59$$

$$K_2 = 2,6 \cdot 10^3 \quad N_2 = 2,38$$

Las ecuaciones de las respectivas rectas de regresión lineal (y_1, y_2) y los coeficientes de correlación vienen expresados en la Fig. 23.

Fig. 22 - UNION DE DEMETILCLORTETRACICLINA A LA SEROALBUMINA BOVINA.

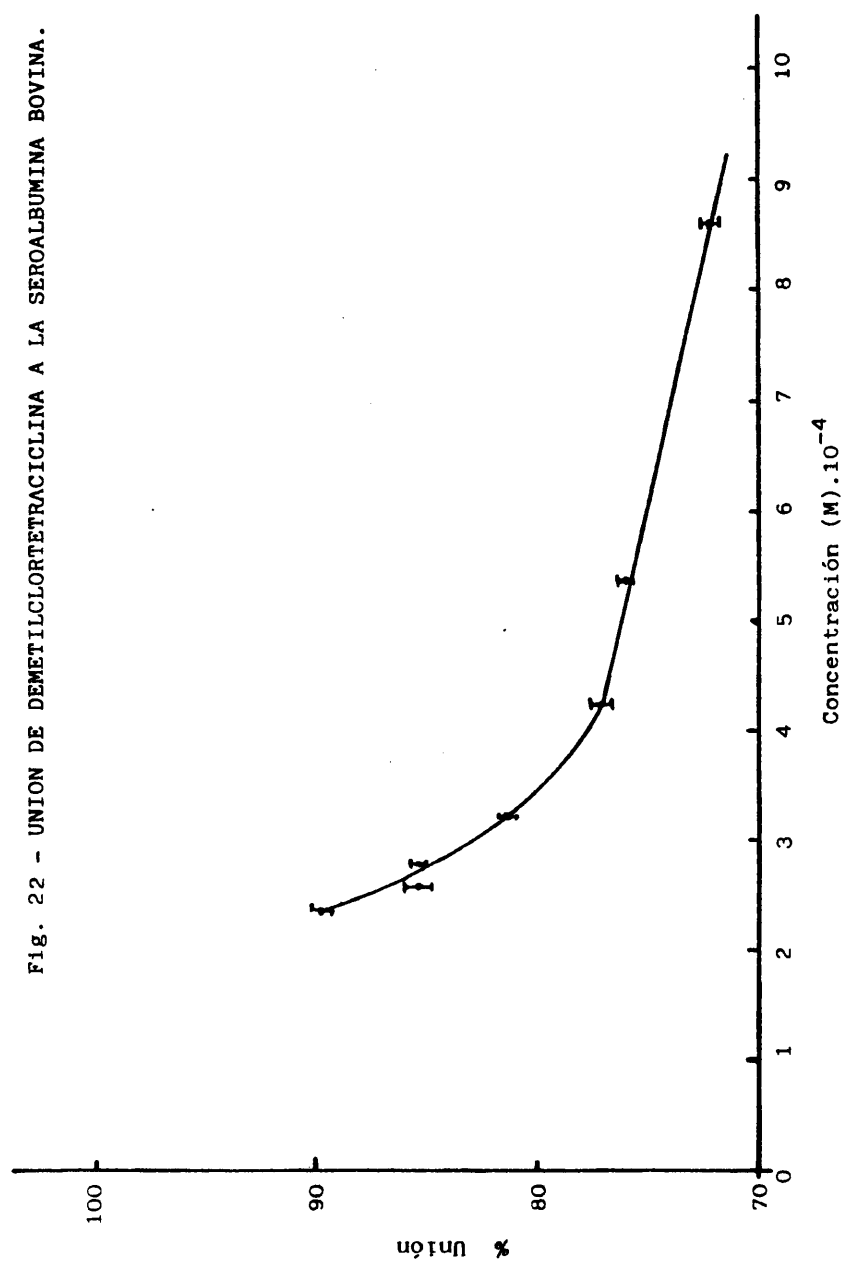


Fig. 23.- UNION DE LA DEMETILCLORTETRACICLINA A LA SEROALBUMINA BOVINA.

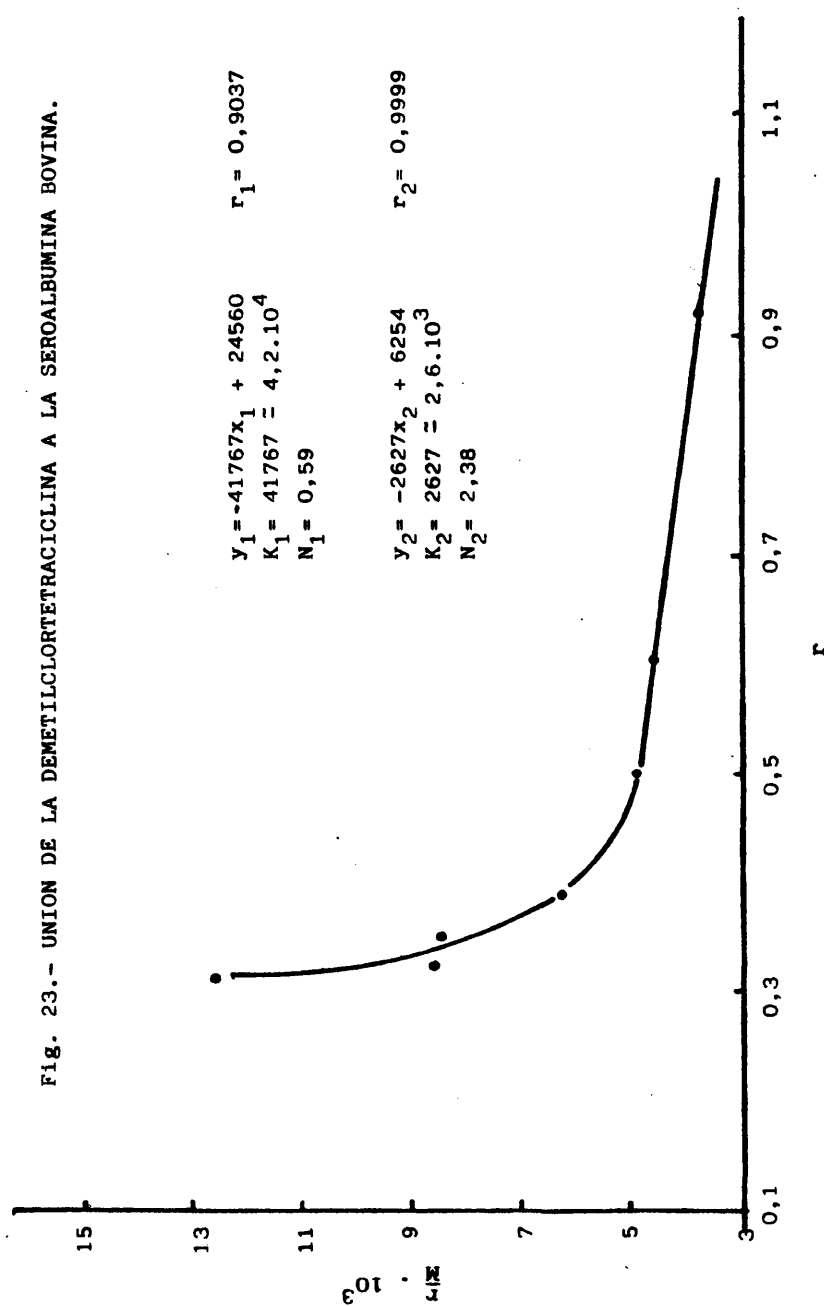


TABLA XIV.- UNIÓN DE LA MINOCICLINA A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión	Valor medio (\bar{U})	Desviación standard (DS)	Error standard de la media (ESM)
2,40 . 10 ⁻⁴ M	90,55	90,46	1,03	0,37
	89,09			
	90,43			
	89,09			
	90,37			
	91,82			
	90,49			
	91,82			
2,84 . 10 ⁻⁴ M	88,55	89,58	0,93	0,33
	90,10			
	90,61			
	89,88			
	88,60			
	88,50			
	90,80			
	89,58			
3,28 . 10 ⁻⁴ M	88,75	88,75	0,68	0,24
	89,10			
	89,78			
	88,96			
	89,00			
	88,90			
	87,72			
	87,80			
3,93 . 10 ⁻⁴ M	86,82	87,78	0,65	0,23
	87,10			
	87,80			
	87,92			
	87,71			
	87,60			
	88,81			
	88,50			

Continuación TABLA XIV.

Concentración	% Unión	Valor medio - (U)	Desviación standard (DS)	Error standard de la media (ESM)
4,37 . 10 ⁻⁴ M	86,93	87,00	0,75	0,27
	88,00			
	87,07			
	86,02			
	86,98			
	85,99			
	87,00			
	88,01			
8,75 . 10 ⁻⁴ M	87,09	87,00		
	87,00			
	87,04			
	86,95			
	86,91			
	86,96			
	87,05			
	87,00			

La representación gráfica de esta Tabla viene dada en la Fig. 24.

Los resultados señalan que el mayor porcentaje de unión de la minociclina a la seroalbúmina bovina se alcanza a la concentración de $2,40 \cdot 10^{-4}$ M, concentración elegida para los estudios posteriores de interacción.

TABLA XV.- UNION DE LA MINOCICLINA A LA SEROALBUMINA BOVINA

Concentración	% Unión	r	M	r/M . 10 ³
2,40 . 10 ⁻⁴ M	90,46	0,3215657	0,0000229	14,04217
2,84 . 10 ⁻⁴ M	89,58	0,3763663	0,0000296	12,715077
3,28 . 10 ⁻⁴ M	88,75	0,4302806	0,0000369	11,66072
3,93 . 10 ⁻⁴ M	87,78	0,5106351	0,0000481	10,61614
4,37 . 10 ⁻⁴ M	87,00	0,5623338	0,0000568	9,900
8,75 . 10 ⁻⁴ M	87,00	1,1246676	0,0001137	9,892

siendo:

r : relación entre moles de fármaco unido a seroalbúmina bovina
y moles totales de proteína.

M : concentración del medicamento libre.

La representación gráfica de esta Tabla (Fig. 25) indica que al menos existen dos clases de sitios de unión. Las constantes de asociación ($K_1; K_2$) y el número de sitios de unión ($N_1; N_2$) para cada clase son:

$$K_1 = 1,7 \cdot 10^4 \quad N_1 = 1,14$$

$$K_2 = 14 \quad N_2 = 707$$

Las ecuaciones de las respectivas rectas de regresión lineal (y_1, y_2) y los coeficientes de correlación (r_1, r_2) vienen expresadas en la Fig. 25.

Fig. 2 4 - UNION DE LA MINOCICLINA A LA SEROALBUMINA BOVINA

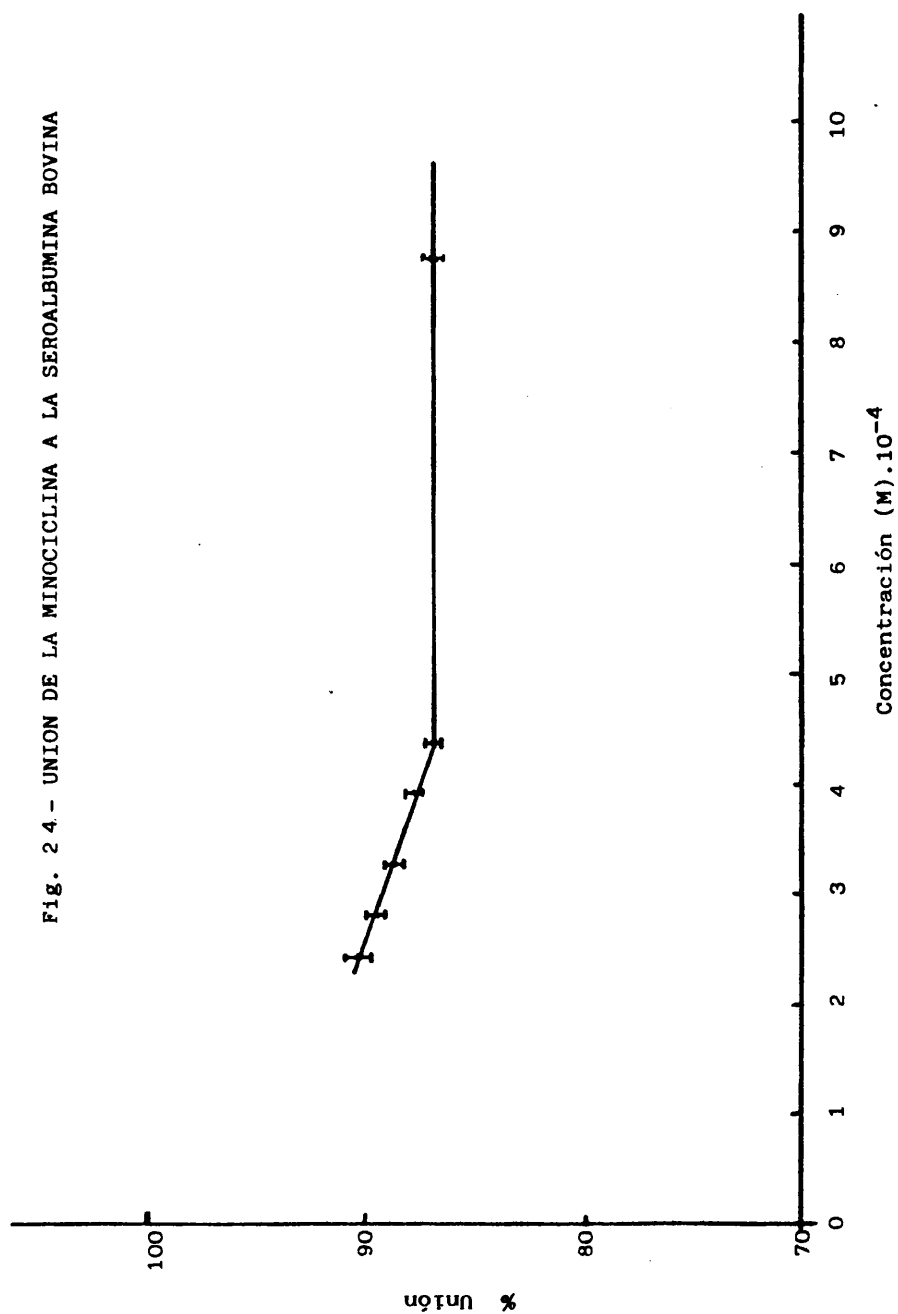


Fig. 25. - UNION DE LA MINOCICLINA A LA SEROALBUMINA BOVINA

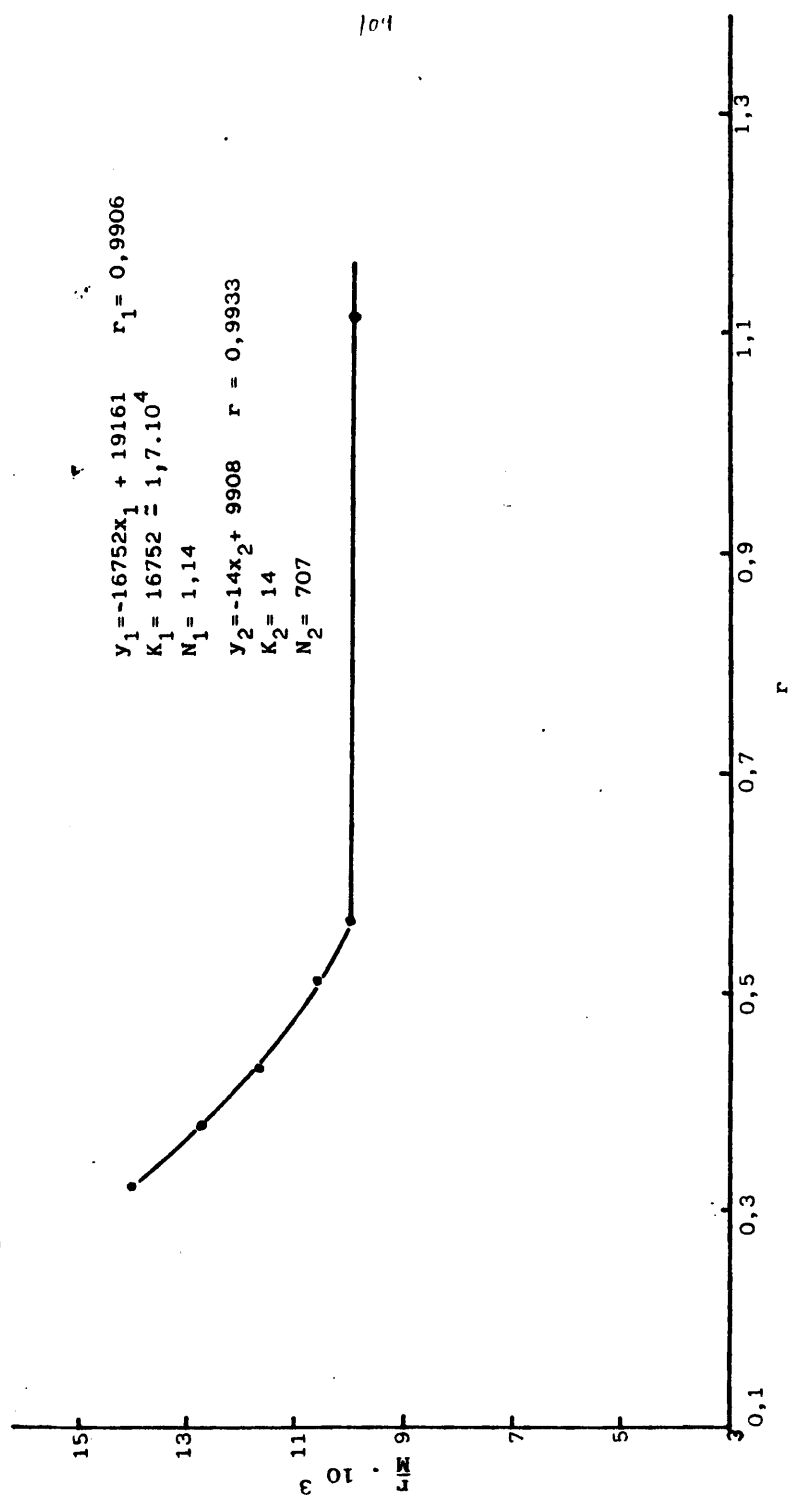


TABLA XVI. UNION DE LA OXITETRACICLINA A LA SEROALBUMINA BOVINA

Concentración	% Unión	Valor medio (\bar{U})	Desviación standard (DS)	Error standard de la media (ESM)
2,39 . 10 ⁻⁴ M	96,49	96,54	0,89	0,32
	95,45			
	96,54			
	96,59			
	98,18			
	95,45			
	96,36			
	97,27			
2,61 . 10 ⁻⁴ M	95,25	94,67	1,23	0,44
	95,88			
	92,38			
	95,63			
	93,88			
	95,83			
	93,83			
	94,67			
2,94 . 10 ⁻⁴ M	91,96	92,02	0,77	0,27
	91,11			
	92,22			
	92,08			
	91,56			
	92,78			
	91,11			
	93,33			
3,26 . 10 ⁻⁴ M	88,00	87,06	0,98	0,35
	86,05			
	87,00			
	87,00			
	86,00			
	86,00			
	88,07			
	88,33			

Continuación TABLA XVI

Concentración	% Unión	Valor medio (U)	Desviación standard (DS)	Error standard de la media (ESM)
3,80 . 10 ⁻⁴ M	83,09	83,46	0,67	0,24
	82,44			
	84,24			
	83,46			
	82,95			
	83,66			
	84,48			
	83,38			
4,35 . 10 ⁻⁴ M	83,00	83,15	0,17	0,06
	83,19			
	83,15			
	83,00			
	83,00			
	83,50			
	83,11			
	83,25			
4,98.10 ⁻⁴ M	82,90	81,87	0,78	0,28
	82,91			
	81,94			
	81,82			
	81,80			
	80,80			
	81,92			
	80,87			
5,80.10 ⁻⁴ M	80,00	81,09	0,97	0,34
	80,04			
	80,07			
	82,13			
	82,14			
	81,14			
	82,16			
	81,04			

La representación gráfica de esta Tabla viene dada en la Figura 26.

Los resultados señalan que el mayor porcentaje de la unión de oxitetraciclina a la seroalbúmina bovina se alcanza a la concentración de $2,39 \cdot 10^{-4}$ M, concentración elegida para los estudios posteriores de interacción.



TABLA XVII.- UNION DE LA OXITETRACICLINA A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión	r	M	$\frac{r}{M} \cdot 10^3$
$2,39 \cdot 10^{-4} M$	96,54	0,3409689	0,0000083	41,210
$2,61 \cdot 10^{-4} M$	94,67	0,3647607	0,0000139	26,232
$2,94 \cdot 10^{-4} M$	92,02	0,3988700	0,0000234	17,033
$3,26 \cdot 10^{-4} M$	87,06	0,4192998	0,0000422	9,938
$3,80 \cdot 10^{-4} M$	83,46	0,4689556	0,0000629	7,453
$4,35 \cdot 10^{-4} M$	83,15	0,5339586	0,0000733	7,289
$4,98 \cdot 10^{-4} M$	81,87	0,6025000	0,0000903	6,667
$5,80 \cdot 10^{-4} M$	81,09	0,7000000	0,0001105	6,333

siendo:

r: relación entre moles de fármaco unido a seroalbumina bovina y moles totales de proteína.

M: concentración del medicamento libre.

La representación gráfica de esta Tabla (Fig. 27) indica que al menos existen dos clases de sitios de unión. Las constantes de asociación (K_1, K_2) y el número de sitios de unión (N_1, N_2) para cada clase son:

$$\begin{array}{ll} K_1 = 3,8 \cdot 10^5 & N_1 = 2,26 \\ K_2 = 2,5 \cdot 10^3 & N_2 = 3,42 \end{array}$$

Las ecuaciones de las respectivas rectas de regresión lineal (y_1, y_2) y los coeficientes de correlación vienen expresados en la Fig. 27.

Fig. 26 - UNION DE OXITETRACICLINA A LA SEROALBUMINA BOVINA

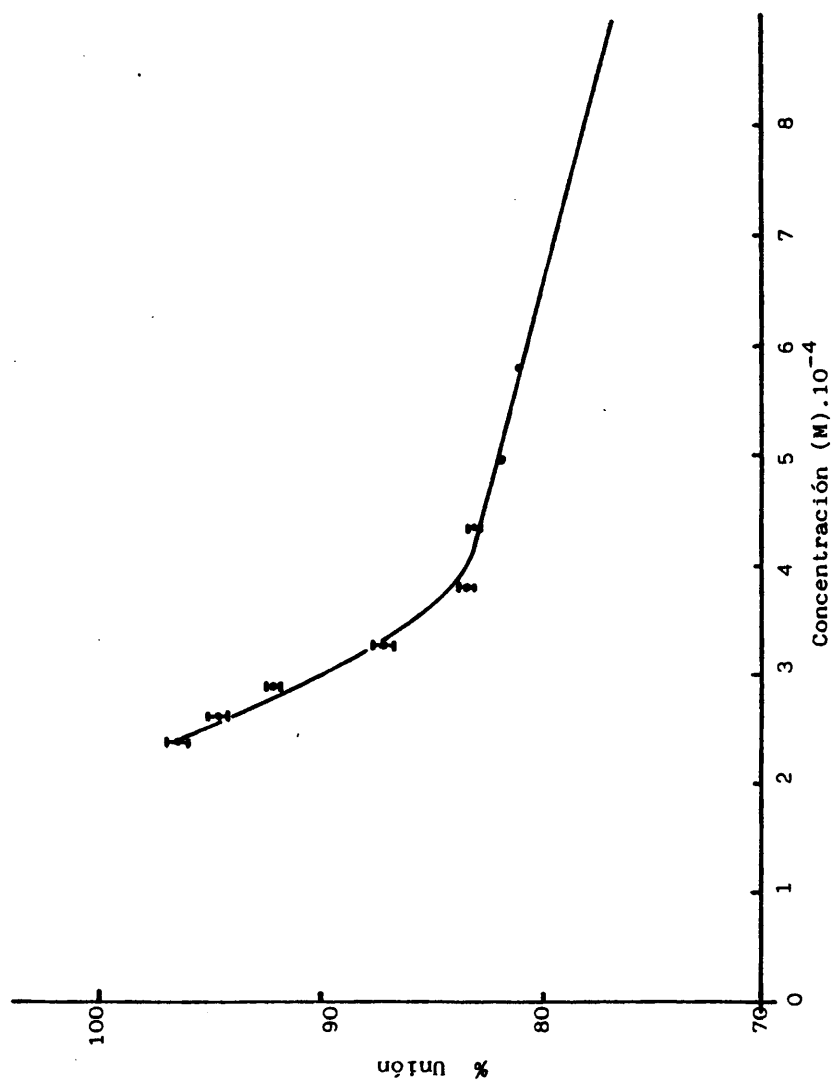


Fig. 27 - UNION DE LA OXITETRACICLINA A LA SEROALBUMINA BOVINA

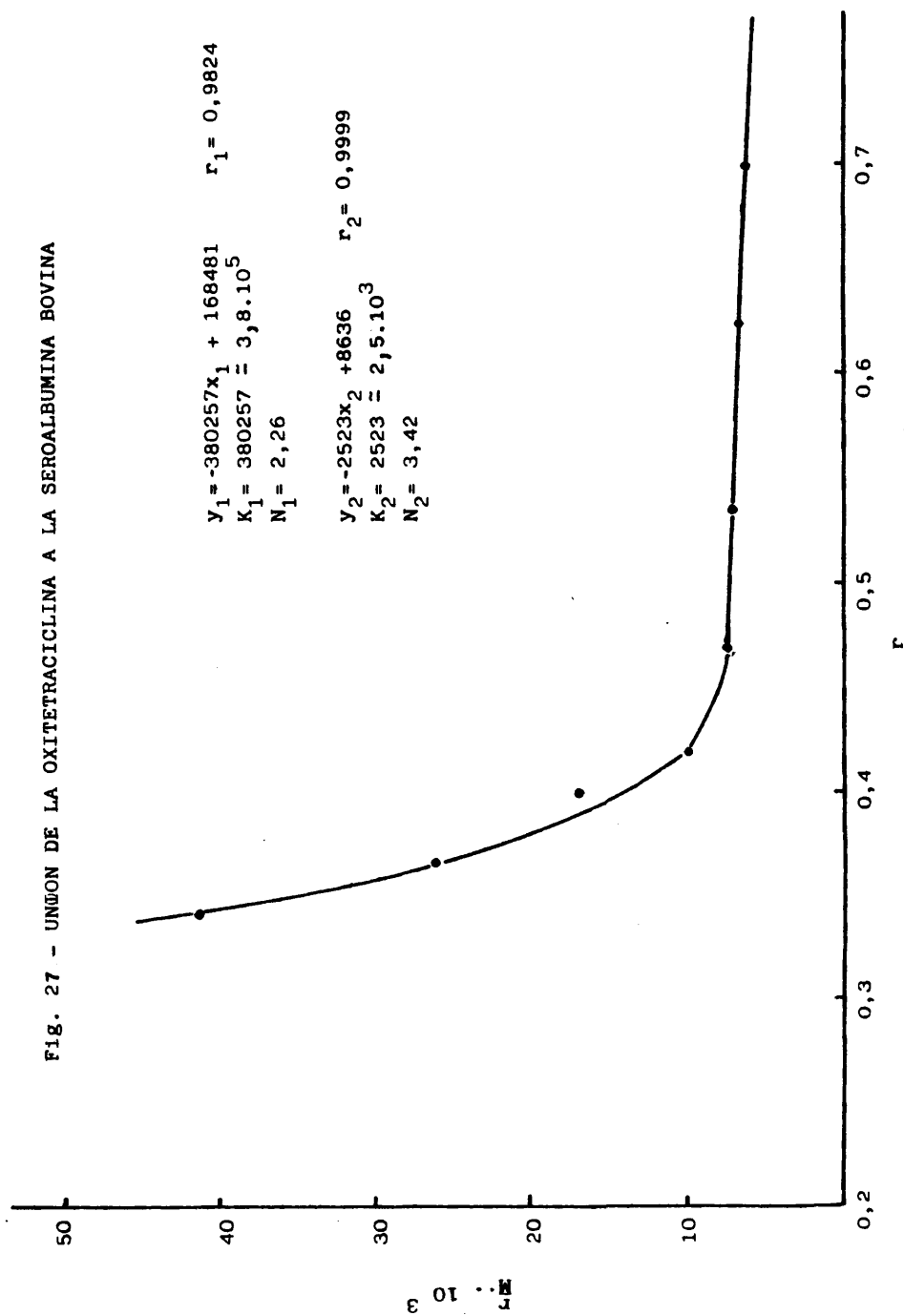


TABLA XVIII,- UNION DE LA TETRACICLINA A LA SEROALBUMINA BOVINA

Concentración	% Unión	Valor medio (U)	Desviación standard (DS)	Error standard de la media (ESM)
1,80. 10^{-4} M	89,97	90,00	0,81	0,29
	89,75			
	90,07			
	91,50			
	90,03			
	88,50			
	89,93			
	90,25			
2,25 . 10^{-4} M	91,72	90,72	0,85	0,30
	90,00			
	89,50			
	92,00			
	90,65			
	90,11			
	91,00			
	90,79			
2,47 . 10^{-4} M	88,92	89,00	0,90	0,32
	87,50			
	90,00			
	89,08			
	90,03			
	89,00			
	87,97			
	89,50			
3,37 . 10^{-4} M	87,84	87,83	0,30	0,11
	87,73			
	87,73			
	87,85			
	87,77			
	88,46			
	87,91			
	87,41			

Continuación TABLA XVIII

Concentración	% Unión	Valor medio (\bar{U})	Desviación standard (DS)	Error standard de la media (ESM)
$6,75 \cdot 10^{-4}M$	87,15	87,10	0,94	0,33
	85,57			
	86,07			
	87,55			
	88,08			
	87,93			
	86,50			
	87,95			
$9,00 \cdot 10^{-4}M$	86,97	87,10	0,60	0,21
	87,45			
	86,05			
	86,85			
	87,18			
	86,75			
	87,40			
	88,15			

La representación gráfica de esta Tabla viene dada en la Fig. 28. Los resultados señalan que el mayor porcentaje de unión de la tetraciclina a la seroalbúmina bovina se alcanza a la concentración de $2,25 \cdot 10^{-4}M$.

TABLA XIX.- UNION DE LA TETRACICLINA A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión	r	M	r/M . 10 ³
2,25 . 10 ⁻⁴ M	90,72	0,3015367	0,0000208	14,497
2,47 . 10 ⁻⁴ M	89,00	0,3254018	0,0000272	11,963
3,37 . 10 ⁻⁴ M	87,83	0,4373978	0,0000414	10,565
6,75 . 10 ⁻⁴ M	87,10	0,8685137	0,0000870	9,983
9,00 . 10 ⁻⁴ M	87,10	1,1580182	0,0001161	9,974

siendo:

r : relación entre moles de fármaco unido a seroalbúmina bovina
y moles totales de proteína.

M : concentración del medicamento libre.

La representación gráfica de esta Tabla (Fig. 29) indica que al menos existen dos clases de sitios de unión. Las constantes de asociación ($K_1; K_2$) y el número de sitios de unión ($N_1; N_2$) para cada clase son:

$$K_1 = 2,4 \cdot 10^4$$

$$N_1 = 0,87$$

$$K_2 = 30$$

$$N_2 = 323,23$$

Las ecuaciones de las respectivas rectas de regresión lineal (y_1 , y_2) y los coeficientes de correlación vienen expresadas en la Fig. 29.

Fig. 28.- UNION DE LA TETRACICLINA A LA SEROALBUMINA BOVINA

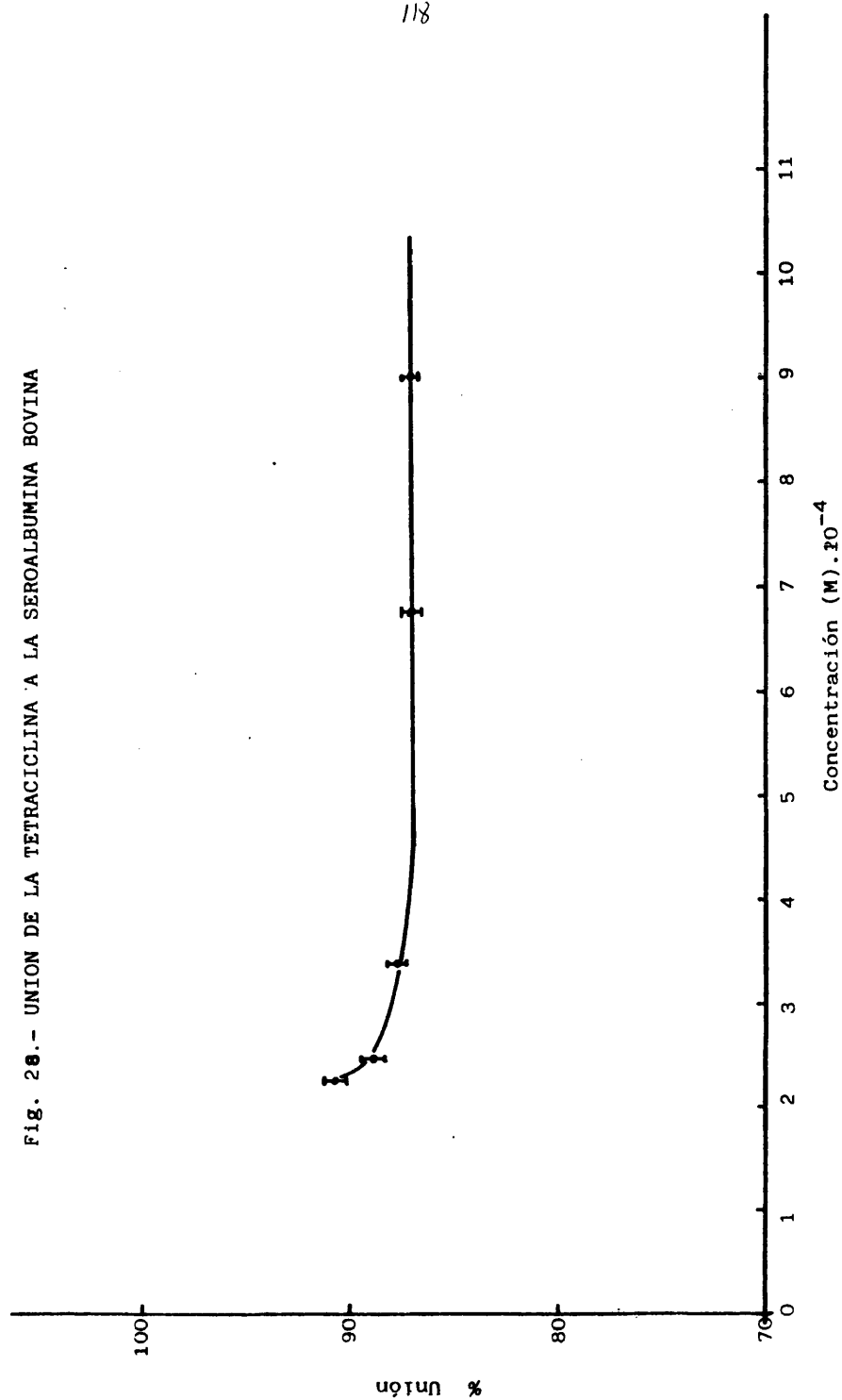
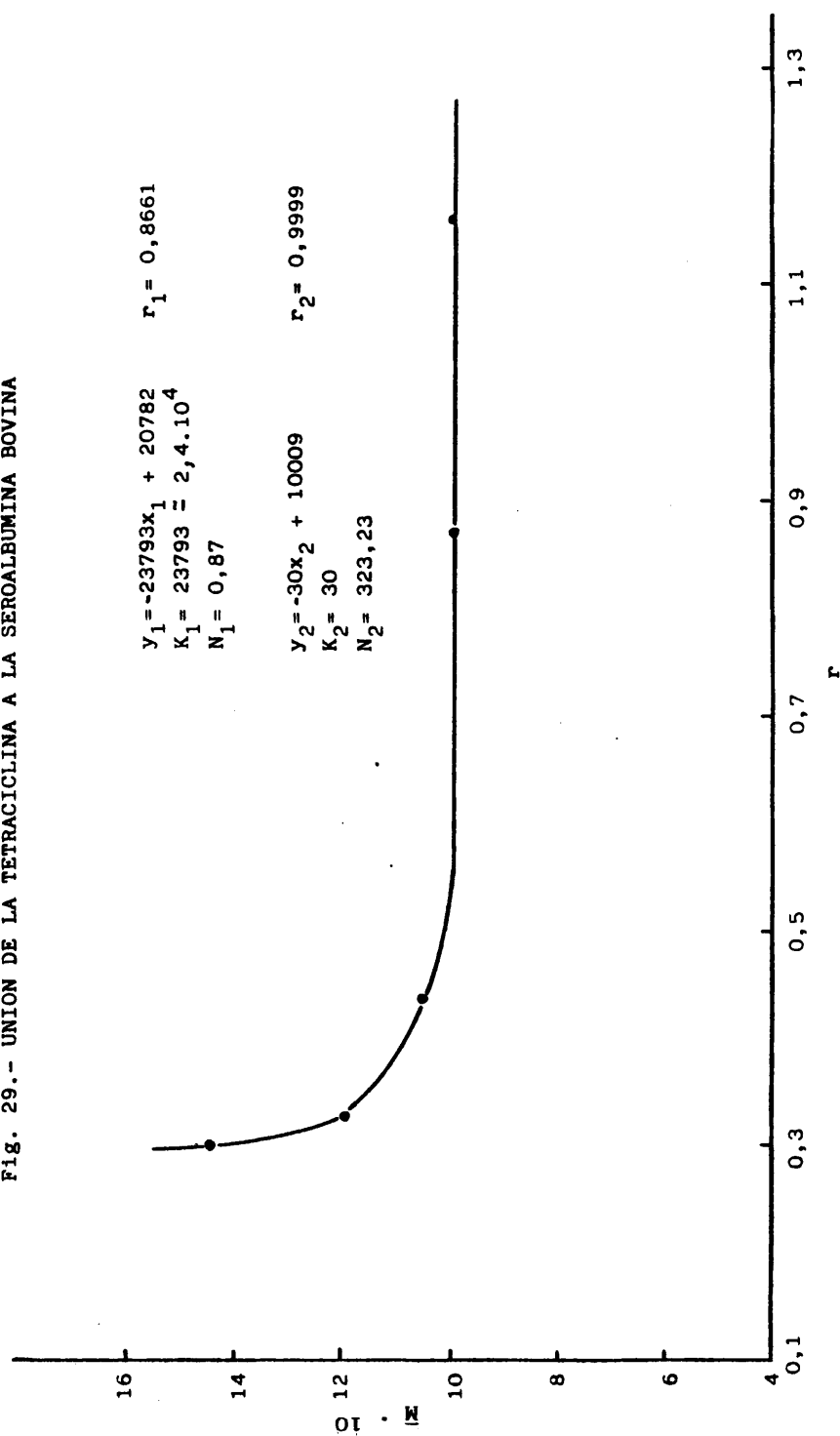


Fig. 29.- UNION DE LA TETRACICLINA A LA SEROALBUMINA BOVINA



3.3. Interacción de la quinidina sobre la unión de una serie de tetraciclinas a la seroalbúmina bovina por ultrafiltración.

Se estudia la interacción de la quinidina a las concentraciones de:

- $1,38 \cdot 10^{-5}M$
- $5,50 \cdot 10^{-6}M$

elegidas por estar dentro del rango terapéutico, sobre la unión de una serie de tetraciclinas a la seroalbúmina bovina.

Las tetraciclinas estudiadas fueron:

- Clortetraciclina a concentración de $2,29 \cdot 10^{-4}M$
- Demetilclortetraciclina a concentración de $2,36 \cdot 10^{-4}M$
- Minociclina a concentración de $2,40 \cdot 10^{-4}M$
- Oxitetraciclina a concentración de $2,39 \cdot 10^{-4}M$
- Tetraciclina a concentración de $2,47 \cdot 10^{-4}M$

Los resultados encontrados para la interacción de la quinidina sobre la unión de la clortetraciclina a la seroalbúmina bovina se expresan en la Tabla XX y gráfica 30.

Los resultados encontrados para la interacción de la quinidina sobre la unión de la demetilclortetraciclina a la seroalbúmina bovina se expresan en la Tabla XXI y gráfica 31.

Los resultados encontrados para la interacción de quinidina sobre la unión de la minociclina a la seroalbúmina bovina se expresan en la Tabla XXII y gráfica 32.

Los resultados encontrados para la interacción de la quinidina sobre la unión de la oxitetraciclina a la seroalbúmina bovina se expresan en la Tabla XXIII y gráfica 33.

Los resultados encontrados para la interacción de la quinidina sobre la unión de la tetraciclina a la seroalbúmina bovina se expresan en la Tabla XXIV y gráfica 34.

Como conclusión la Tabla XXV recoge los valores del desplazamiento originado por la quinidina sobre la unión de una serie de tetraciclinas a la seroalbúmina bovina.

TABLA XX .- INTERACCION DE LA QUINIDINA A CONCENTRACIONES DE $1,38.10^{-5}M$ y $5,50.10^{-6}M$ SOBRE LA UNION DE LA CLOR-TETRACICLINA (CTC) A CONCENTRACION DE $2,29.10^{-4}M$ A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión CTC	% Unión de CTC en presencia de quinidina	Valor medio (Ū)	Desviación standard (DS)	Error standard de la media (ESM)
CTC $2,29.10^{-4}M$ Quinidina $1,38.10^{-5}M$	92,62	93,18 90,00 90,91 90,02 87,92 87,93 90,01 81,82	88,97	3,33	1,18
CTC $2,29.10^{-4}M$ Quinidina $5,50.10^{-6}M$	92,62	86,43 83,40 84,60 85,75 83,95 84,35 84,25 85,15	84,74	0,98	0,35

Los resultados demuestran que la quinidina a concentración de $1,38.10^{-5}M$ desplaza un valor de 3,65 en el porcentaje de unión de la clortetraciclina a la seroalbúmina bovina. Similarmente la quinidina a concentración inferior de $5,50.10^{-6}M$ origina un mayor desplazamiento en la unión de la clortetraciclina a la seroalbúmina bovina ya que el valor encontrado es 7,88. Los valores medios de esta Tabla XX vienen representados en la Fig. 30 con el cálculo estadístico correspondiente para el estudio de su significación (análisis de varianza, t de Student).

Fig. 30. INTERACCION DE LA QUINIDINA(Q) A CONCENTRACIONES DE $1,38 \cdot 10^{-5}M$ Y $5,5 \cdot 10^{-6}M$ SOBRE LA UNION DE LA CLORTETRACICLINA A CONCENTRACION DE $2,29 \cdot 10^{-4}M$ A LA SEROALBUMINA BOVINA.

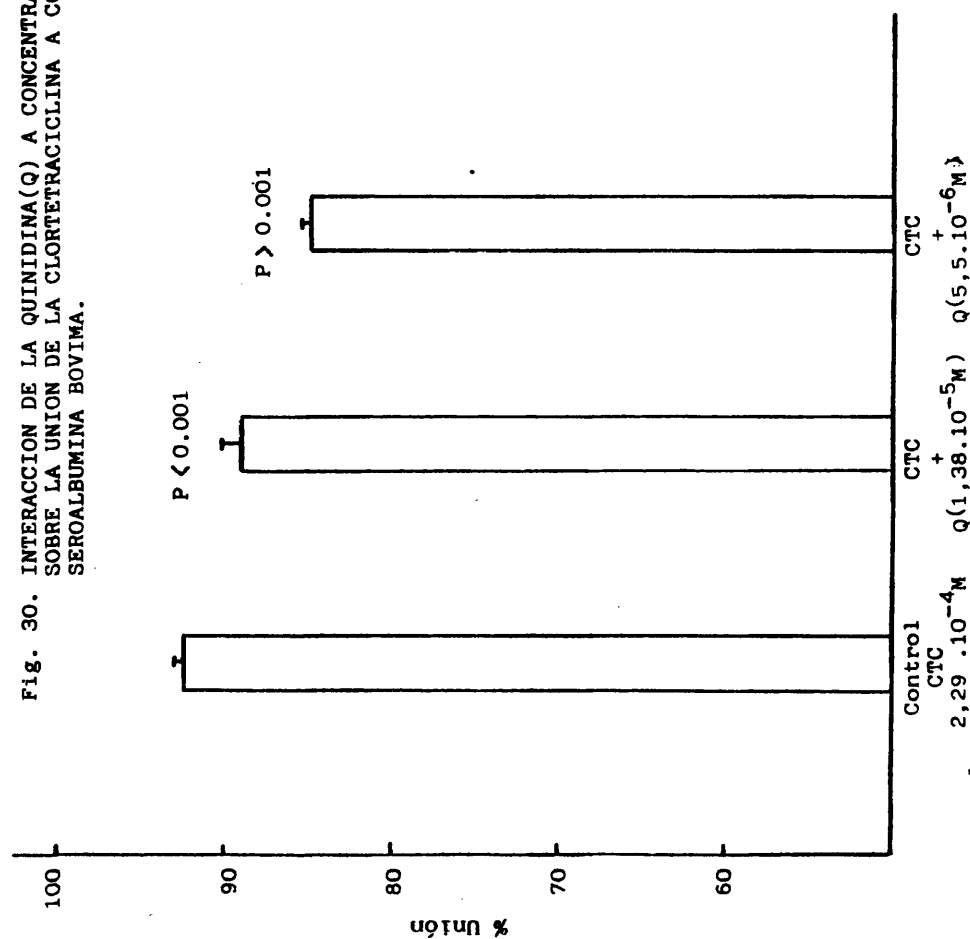


TABLA XXI. - INTERACCION DE LA QUINIDINA A CONCENTRACIONES DE $1,38.10^{-5}M$ y $5,50.10^{-6}M$ SOBRE LA UNION DE LA DEMETILCLORTETRACICLINA (DMCTC) A CONCENTRACION DE $2,36.10^{-4}M$ A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión DMCTC	% Unión de DMCTC en presencia de quinidina	Valor medio (\bar{U})	Desviación standard (DS)	Error standard de la media (ESM)
DMCTC $2,36.10^{-4}M$ Quinidina $1,38.10^{-5}M$	89,54	85,32 81,82 72,73 73,83 75,00 72,73 77,95 75,85	76,90	4,55	1,61
DMCTC $2,36.10^{-4}M$ Quinidina $5,50.10^{-6}M$	89,54	74,48 72,73 70,00 74,09 72,34 76,82 72,73 74,09	73,41	1,97	0,70

Los resultados demuestran que la quinidina a concentración de $1,38.10^{-5}M$ desplaza un valor de 12,64 en el porcentaje de unión de la demetilclortetraciclina a la seroalbúmina bovina. Similarmente la quinidina a concentración inferior de $5,50.10^{-6}M$ origina un mayor desplazamiento en la unión de la demetilclortetraciclina a la seroalbúmina bovina siendo el valor encontrado de 16,13. Los valores medios de esta Tabla XXI vienen representados en la Fig. 31 con el cálculo estadístico correspondiente para el estudio de su significación (análisis de varianza, t de Student).

Fig. 31. INTERACCION DE LA QUINIDINA(Q) A CONCENTRACIONES DE $1,38 \cdot 10^{-5}M$ Y $5,5 \cdot 10^{-6}M$ SOBRE LA UNION DE LA DEMETILCLORTETRACICLINA (DMCTC) A CONCENTRACION DE $2,36 \cdot 10^{-4}M$ A LA SEROALBUMINA BOVINA.

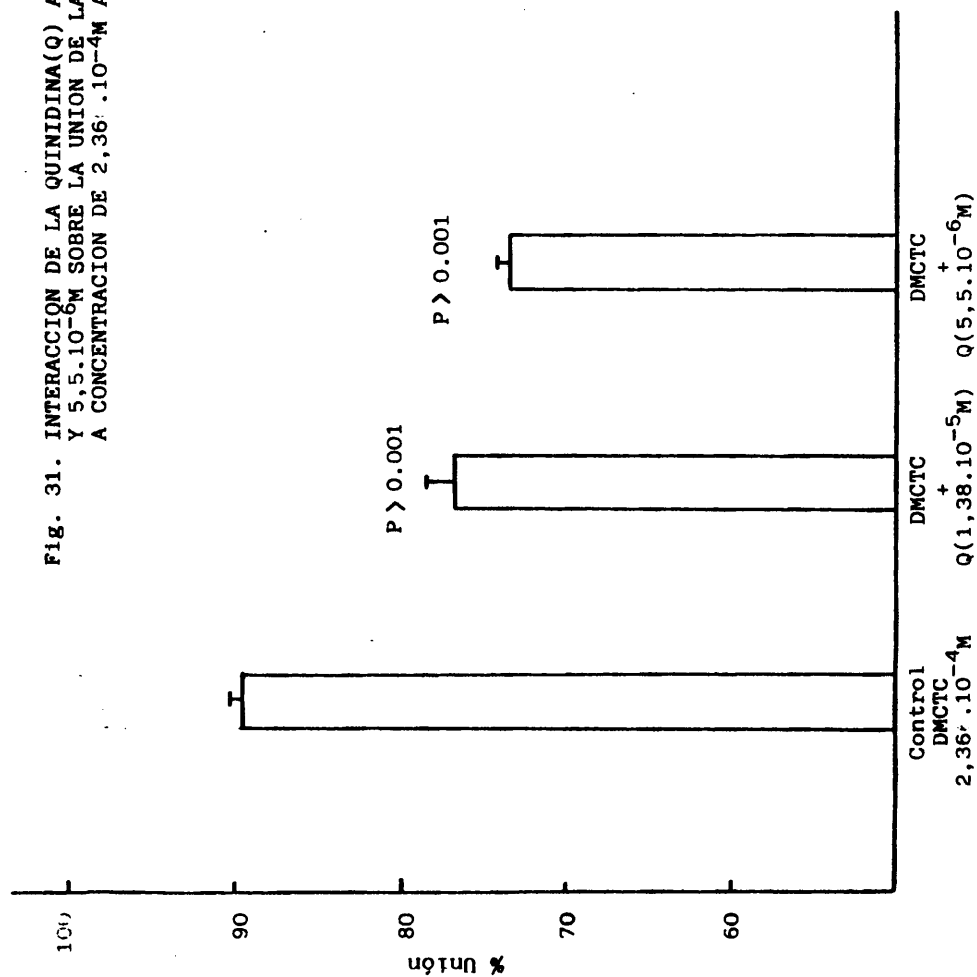


TABLA XXII. INTERACCION DE LA QUINIDINA A CONCENTRACIONES DE $1,38.10^{-5}M$ y $5,50.10^{-6}M$ SOBRE LA UNION DE LA MINOCICLINA (MNC) A CONCENTRACION DE $2,40.10^{-4}M$ A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión MNC	% Unión de MNC en presencia de quinidina	Valor medio (U)	Desviación standard (DS)	Error standard de la media (ESM)
MNC $2,40.10^{-4}M$ Quinidina $1,38.10^{-5}M$	90,46	89,57 89,46 89,09 87,51 89,54 89,09 85,00 89,09	88,54	1,57	0,56
MNC $2,40.10^{-4}M$ Quinidina $5,50.10^{-6}M$	90,46	87,27 90,91 90,21 90,91 88,18 90,05 93,41 90,13	90,13	1,84	0,65

Los resultados demuestran que la quinidina a concentracion de $1,38.10^{-5}M$ desplaza un valor de 1,92 en el porcentaje de unión de la minociclina a la seroalbúmina bovina. Similarmente la quinidina a concentración inferior de $5,50.10^{-6}M$ origina un menor desplazamiento en la unión de la minociclina a la seroalbúmina bovina ya que el valor encontrado es de 0,33. Los valores medios de esta Tabla XXII vienen representados en la Fig. 32 con el cálculo estadístico correspondiente para el estudio de su significación (análisis de varianza, t de Student).

Fig. 32. INTERACCION DE LA QUINIDINA(Q) A CONCENTRACIONES DE $1.38.10^{-5}M$ Y $5.5.10^{-6}M$ SOBRE LA UNION DE LA MINOCICLINA (MNC) A CONCENTRACION DE $2.40.10^{-4}M$ A LA SEROALBUMINA BOVINA.

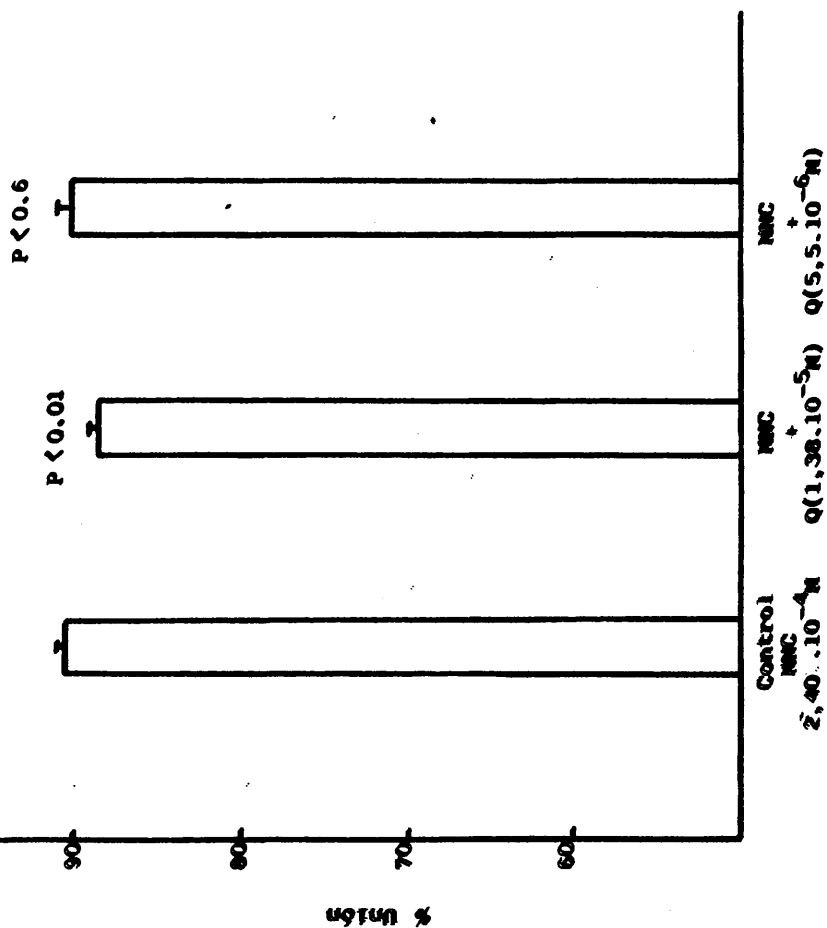


TABLA XXIII. INTERACCION DE LA QUINIDINA A CONCENTRACIONES DE $1,38.10^{-5}M$ y $5,50.10^{-6}M$ SOBRE LA UNION DE LA OXITETRA-
CICLINA (OTC) A CONCENTRACION DE $2,39.10^{-4}M$ A LA SE-
ROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión OTC	% Unión de OTC en pre- sencia de qui- nidina	Valor medio (\bar{U})	Desviación standard (DS)	Error stan- dard de la media (ESM)
OTC $2,39.10^{-4}M$ Quinidina $1,38.10^{-5}M$	96,54	89,90	90,90	1,69	0,60
		91,18			
		91,96			
		92,91			
		93,18			
		88,36			
		89,89			
		89,84			
OTC $2,39.10^{-4}M$ Quinidina $5,50.10^{-6}M$	96,54	91,82	89,56	2,63	0,93
		89,09			
		90,91			
		87,27			
		92,73			
		86,36			
		86,36			
		91,92			

Los resultados demuestran que la quinidina a concentración de $1,38.10^{-5}M$ desplaza un valor de 5,64 en el porcentaje de unión de la oxitetraciclina a la seroalbúmina bovina. Similarmente la quinidina a concentración inferior de $5,50.10^{-6}M$ origina un mayor desplazamiento en la unión de la oxitetraciclina a la seroalbúmina bovina ya que el valor encontrado fue de 6,98. Los valores medios de esta Tabla XXIII vienen representados en la Fig. 33 con el cálculo estadístico correspondiente para el estudio de su significación (análisis de varianza, t de Student).

Fig. 33. INTERACCION DE LA QUINIDINA(Q) A CONCENTRACIONES DE $1,38 \cdot 10^{-5}M$ Y $5,5 \cdot 10^{-6}M$ SOBRE LA UNION DE LA OXITETRACICLINA (OTC) A CONCENTRACION DE $2,39 \cdot 10^{-4}M$ A LA SEROALBUMINA BOVINA.

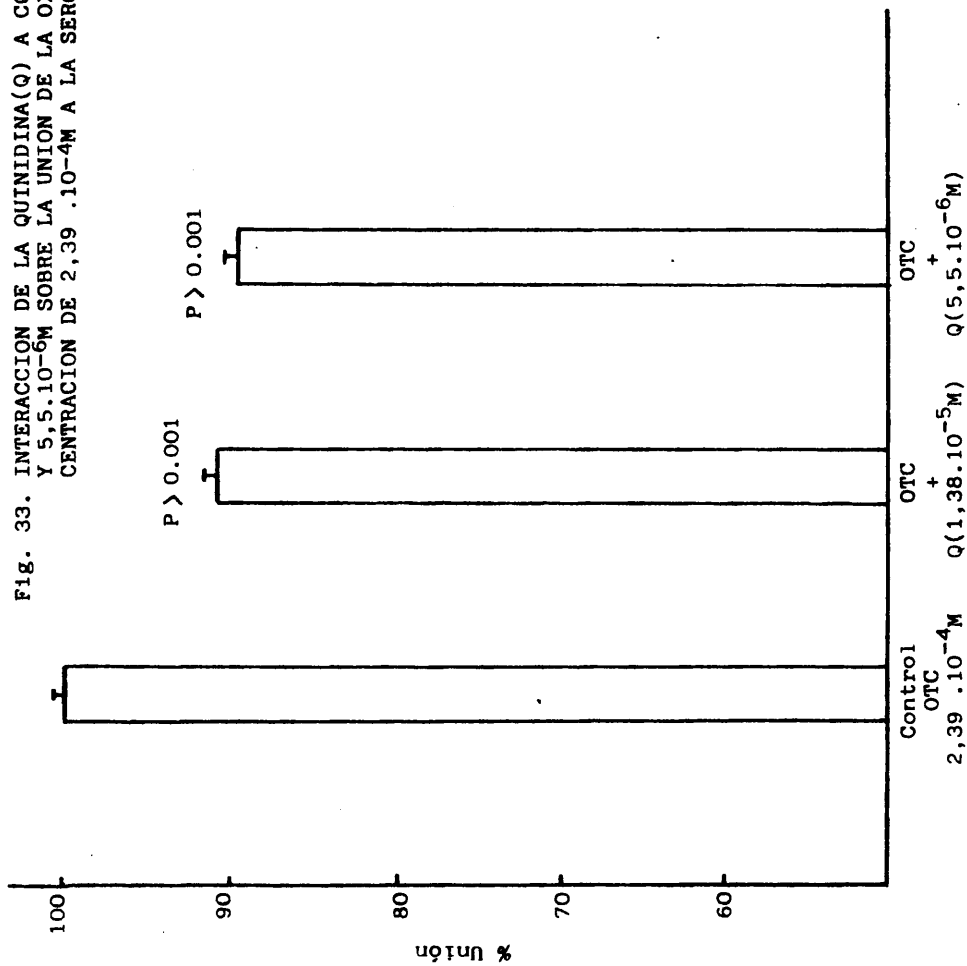


TABLA XXIV. INTERACCION DE LA QUINIDINA A CONCENTRACIONES DE $1,38.10^{-5}M$ Y $5,50.10^{-6}M$ SOBRE LA UNION DE LA TETRACICLINA (TCC) A CONCENTRACION DE $2,47.10^{-4}M$ A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión TCC	% Unión de TCC en pre- sencia de qui- nidina	Valor medio (\bar{U})	Desviación standard (DS)	Error stan- dard de la media (ESM)
TCC $2,47.10^{-4}M$ Quinidina $1,38.10^{-5}M$	89,00	89,09 87,98 89,09 90,00 85,88 83,64 82,83 86,93	86,93	2,63	0,93
TCC $2,47.10^{-4}M$ Quinidina $5,50.10^{-6}M$	89,00	84,34 82,27 83,64 86,82 86,38 85,00 89,09 85,36	85,36	2,09	0,74

Los resultados demuestran que la quinidina a concentración de $1,38.10^{-5}M$ desplaza un valor de 2,07 en el porcentaje de unión de la tetraciclina a la seroalbúmina bovina. Similarmente la quinidina a concentración inferior de $5,50.10^{-6}M$ origina un mayor desplazamiento en la unión de la tetraciclina a la seroalbúmina bovina ya que el valor encontrado es de 3,64. Los valores medios de esta tabla XXIV vienen representados en la Fig. 34 con el cálculo correspondiente para el estudio de su significación (análisis de varianza, t de Student).

Fig. 34. INTERACCION DE LA QUINIDINA(Q) A CONCENTRACION DE $1.38 \cdot 10^{-5}M$ Y $5.5 \cdot 10^{-6}M$ SOBRE LA UNION DE LA TETRACICLINA (TCC) A CONCENTRACION DE $2.47 \cdot 10^{-4}M$ A LA SEROALBUMINA BOVINA.

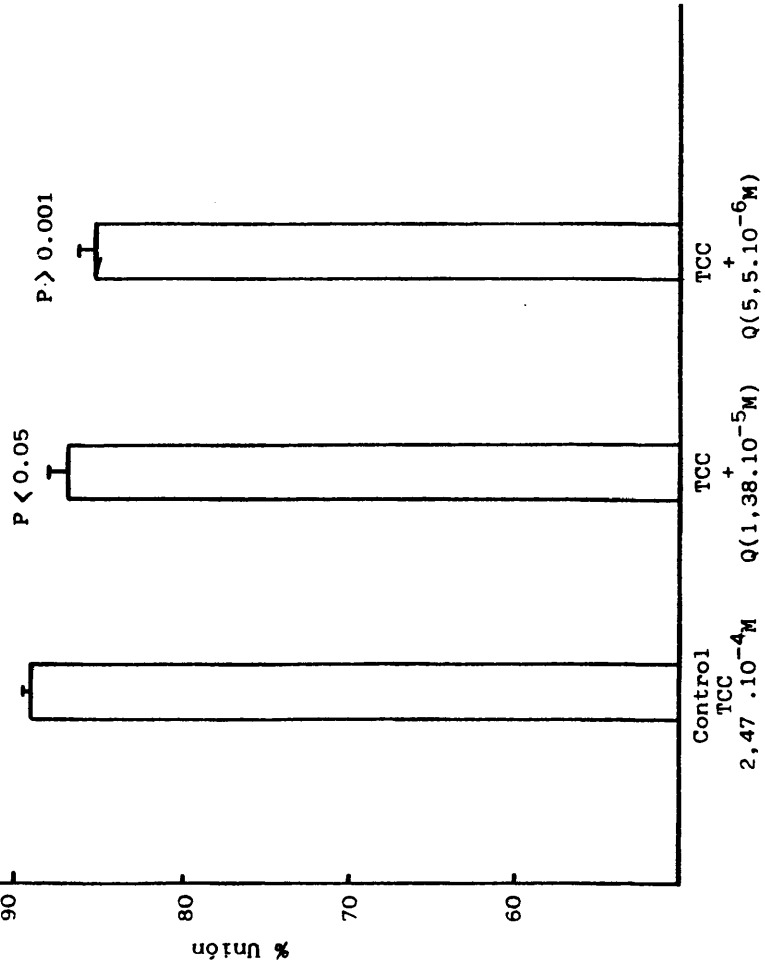


TABLA XXV.- DESPLAZAMIENTO ORIGINADO POR LA QUINIDINA A CONCENTRACIONES DE $(1,38.10^{-5}M$ y $5,50.10^{-6}M$) SOBRE LA UNION DE UNA SERIE DE TETRACICLINAS A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Tetraciclinas	Desplazamiento por quinidina	
	$(1,38.10^{-5}M)$	$(5,50.10^{-6}M)$
Clortetraciclina ($2,29.10^{-4}M$)	3,65	7,88
Demetilclortetraciclina ($2,36.10^{-4}M$)	12,64	16,13
Minociclina ($2,40.10^{-4}M$)	1,92	0,33
Oxitetraciclina ($2,39.10^{-4}M$)	5,64	6,98
Tetraciclina ($2,47.10^{-4}M$)	2,07	3,64

Los resultados observados señalan que el desplazamiento máximo originado por la quinidina afecta a la demetilclortetraciclina.

3.4. Interacción de una serie de tetraciclinas sobre la unión de la quinidina a la seroalbúmina bovina por ultrafiltración.

Se estudia la interacción de una serie de tetraciclinas a concentraciones de:

- clortetraciclina a concentración de $2,29 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- demetilclortetraciclina a concentración de $2,36 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- minociclina a concentración de $2,40 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- oxitetraciclina a concentración de $2,39 \cdot 10^{-4} \text{M}$
- tetraciclina a concentración de $2,47 \cdot 10^{-4} \text{M}$

sobre la unión de la quinidina a concentraciones de $1,38 \cdot 10^{-4} \text{M}$ y $5,50 \cdot 10^{-6} \text{M}$ a la seroalbúmina bovina.

Los resultados encontrados para la interacción de la clortetraciclina sobre la unión de la quinidina a la seroalbúmina bovina se expresan en la Tabla XXVI y gráfica 35.

Los resultados encontrados para la interacción de la demetilclortetraciclina sobre la unión de la quinidina a la seroalbúmina bovina se expresan en la Tabla XXVII y gráfica 36.

Los resultados encontrados para la interacción de la minociclina sobre la unión de la quinidina a la seroalbúmina bovina se expresan en la Tabla XXVIII y gráfica 37.

Los resultados encontrados para la interacción de la oxitetraciclina sobre la unión de la quinidina a la seroalbúmina bovina se expresan en la Tabla XXIX y gráfica 38.

Los resultados encontrados para la interacción de la tetraciclina sobre la unión de la quinidina a la seroalbúmina bovina se expresan en la Tabla XXX y gráfica 39.

-134-

Como conclusión la Tabla XXXI recoge los valores del desplazamiento originado por las tetraciclinas estudiadas sobre la unión de la quinidina a la seroalbúmina bovina.

TABLA XXVI.- INTERACCION DE LA CLORTETRACICLINA (CTC) A CONCENTRACION DE $2,29.10^{-4}M$ SOBRE LA UNIÓN DE LA QUINIDINA A CONCENTRACIONES DE $1,38.10^{-5}M$ y $5,50.10^{-6}M$ A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión de quinidina	% Unión de quinidina en presencia de CTC	Valor medio (\bar{U})	Desviación standard (DS)	Error standard de la media (ESM)
CTC $2,29.10^{-4}M$ Quinidina $1,38.10^{-5}M$	71,57	57,38 56,39 56,30 53,25 54,36 56,42 54,27 54,24	55,33	1,46	0,52
CTC $2,29.10^{-4}M$ Quinidina $5,50.10^{-6}M$	79,00	60,30 62,50 57,50 62,50 50,00 61,15 55,11 55,96	58,13	4,34	1,54

Los resultados demuestran que la clortetraciclina a concentración de $2,29.10^{-4}M$ desplaza un valor de 16,24 en el porcentaje de unión de la quinidina ($1,38.10^{-5}M$) a la seroalbúmina bovina. Similarmente la clortetraciclina origina un mayor desplazamiento en la unión de la quinidina ($5,50.10^{-6}M$) a la seroalbúmina bovina, siendo el valor encontrado 20,87. Los valores medios de esta Tabla XXVI vienen representados en la Fig. 35 con el cálculo estadístico correspondiente para el estudio de su significación (análisis de varianza, t de Student).

Fig. 35.- INTERACCION DE LA CLORTETRACICLINA (CTC) A CONCENTRACION DE $2,29.10^{-4}M$ SOBRE LA UNION DE LA QUINIDINA (Q) A CONCENTRACIONES DE $1,38.10^{-5}M$ Y $5,50.10^{-6}M$ A LA SEROALBUMINA BOVINA.

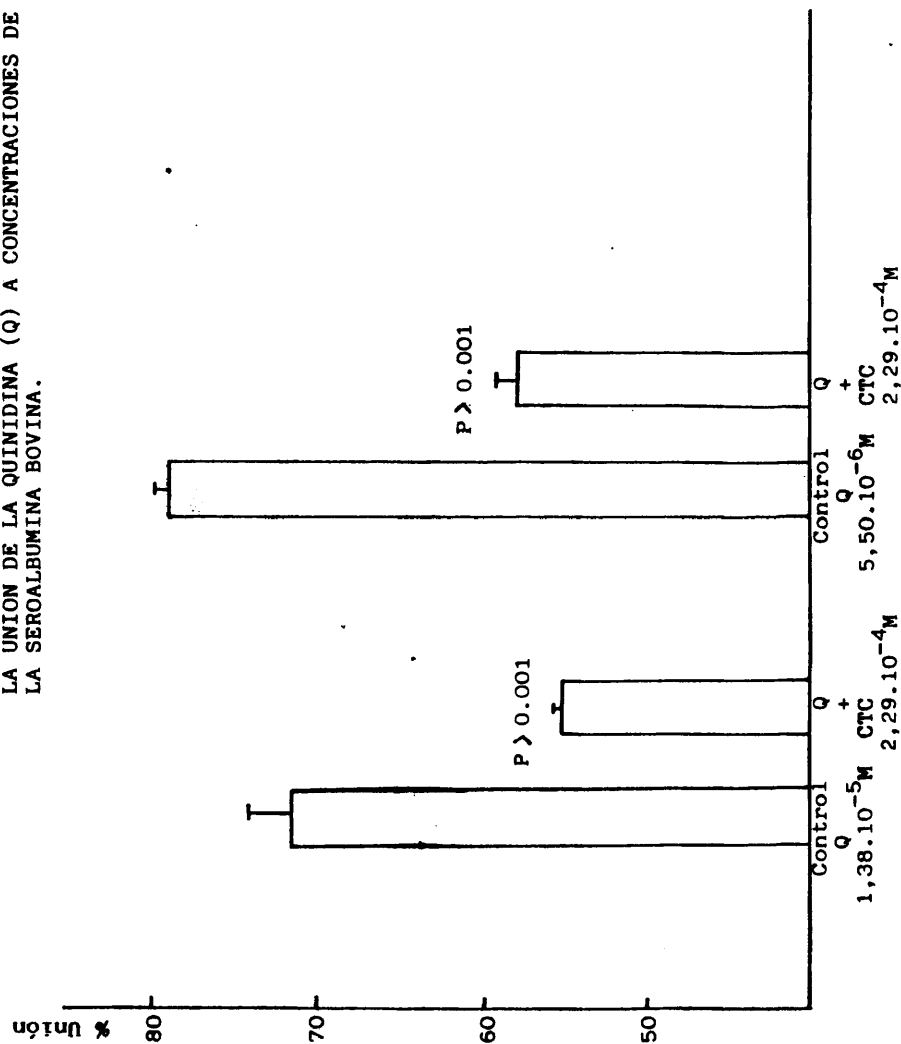


TABLA XXVII.- INTERACCIÓN DE LA DEMETILCLORTETRACICLINA (DMCTC)
A CONCENTRACION DE $2,36.10^{-4}M$ SOBRE LA UNION DE
LA QUINIDINA A CONCENTRACION DE $1,38.10^{-5}M$ y
 $5,50.10^{-6}M$ A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Union de qui- nidina	% Unión de qui- nidina en pre- sencia de DMCTC	Valor medio (\bar{U})	Desviación standard (DS)	Error standard de la media (ESM)
DMCTC $2,36.10^{-4}M$ Quinidina $1,38.10^{-5}M$	71,57	60,00 56,00 56,00 57,00 61,00 59,29 57,11 59,20	58,20	1,91	0,68
DMCTC $2,36.10^{-4}M$ Quinidina $5,50.10^{-6}M$	79,00	57,50 57,50 57,50 50,50 57,50 60,00 57,50 62,50	57,50	3,53	1,25

Los resultados demuestran que la demetilclortetraciclina a concentración de $2,36.10^{-4}M$ desplaza un valor de 13,37 en el porcentaje de unión de la quinidina ($1,38.10^{-5}M$) a la seroalbúmina bovina. Similarmente la demetilclortetraciclina origina un mayor desplazamiento en la unión de la quinidina ($5,50.10^{-6}M$) a la seroalbúmina bovina, siendo el valor encontrado 21,50. Los valores medios de esta Tabla XXVII vienen representados en la Fig. 36 con el cálculo estadístico correspondiente para el estudio de su significación (análisis de varianza, t de Student).

Fig. 36.- INTERACCION DE LA DEMETILCLORTETRACICLINA (DMCTC) A CONCENTRACION DE $2,36.10^{-4}M$ SOBRE LA UNION DE LA QUINIDINA (Q) A CONCENTRACIONES DE $1,38.10^{-5}M$ Y $5,50.10^{-6}M$ A LA SEROALBUMINA BOVINA.

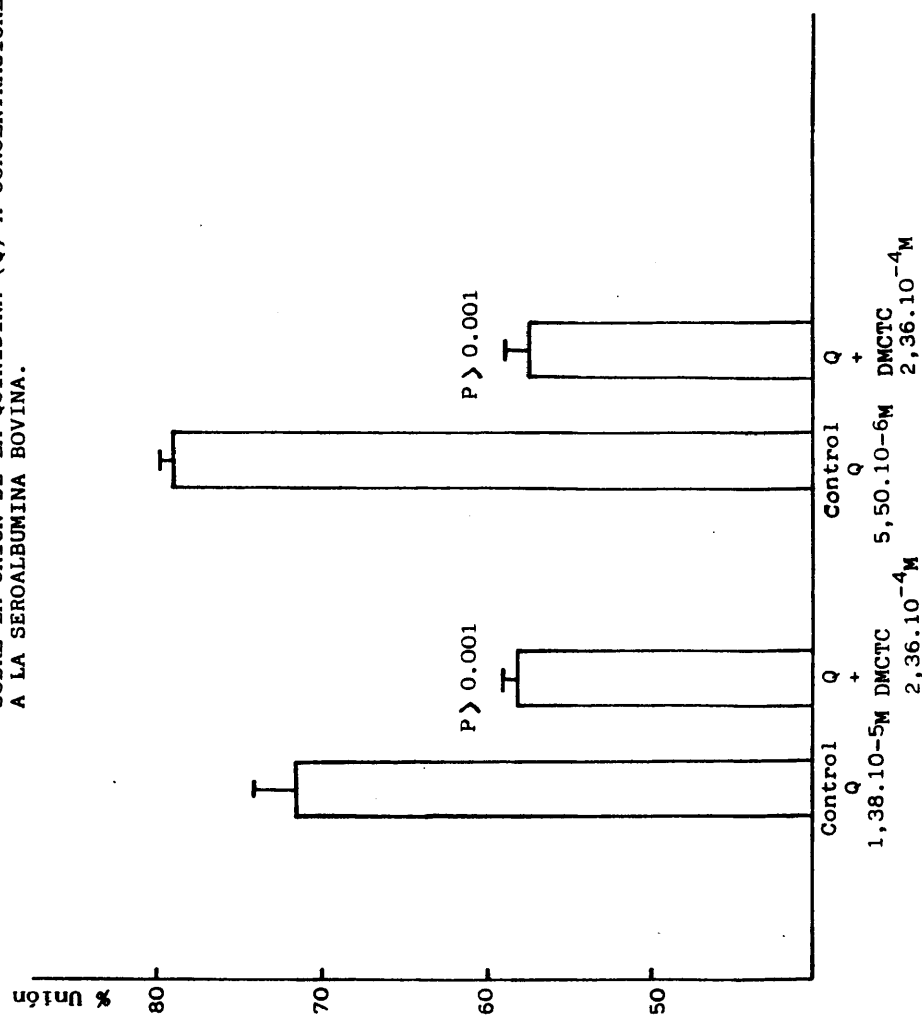


TABLA XXVIII.- INTERACCION DE LA MINOCICLINA (MNC) A CONCENTRACION DE $2,40 \cdot 10^{-4}M$ SOBRE LA UNION DE LA QUINIDINA A CONCENTRACIONES DE $1,38 \cdot 10^{-5}M$ y $5,50 \cdot 10^{-6}M$ A LA SERO-ALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión de quinidina	% Unión de quinidina en presencia de MNC	Valor medio (U)	Desviación standard (DS)	Error standard de la media (ESM)
MNC $2,40 \cdot 10^{-4}M$ Quinidina $1,38 \cdot 10^{-5}M$	71,57	57,81 55,77 57,51 55,69 54,68 55,99 58,82 57,73	56,75	1,40	0,50
MNC $2,40 \cdot 10^{-4}M$ Quinidina $5,50 \cdot 10^{-6}M$	79,00	60,34 58,36 61,37 58,30 57,27 60,18 58,46 60,25	59,32	1,40	0,50

Los resultados demuestran que la minociclina a concentración de $2,40 \cdot 10^{-4}M$ desplaza un valor de 14,82 en el porcentaje de unión de la quinidina ($1,38 \cdot 10^{-5}M$) a la seroalbúmina bovina. Similarmente la minociclina origina un mayor desplazamiento en la unión de la quinidina ($5,50 \cdot 10^{-6}M$) a la seroalbúmina bovina, siendo el valor encontrado 19,68. Los valores medios de esta Tabla XXVIII vienen representados en la Fig. 37 con el calculo estadístico correspondiente para el estudio de su significación (análisis de varianza, t de Student).

Fig. 37.- INTERACCION DE LA MINOCICLINA (MNC) A CONCENTRACION DE $2,401.0^{-4}M$ SOBRE LA UNION DE LA QUINIDINA (Q) A CONCENTRACIONES DE $1,38.10^{-5}M$ Y $5,50.10^{-6}M$ A LA SEROALBUMINA BOVINA.

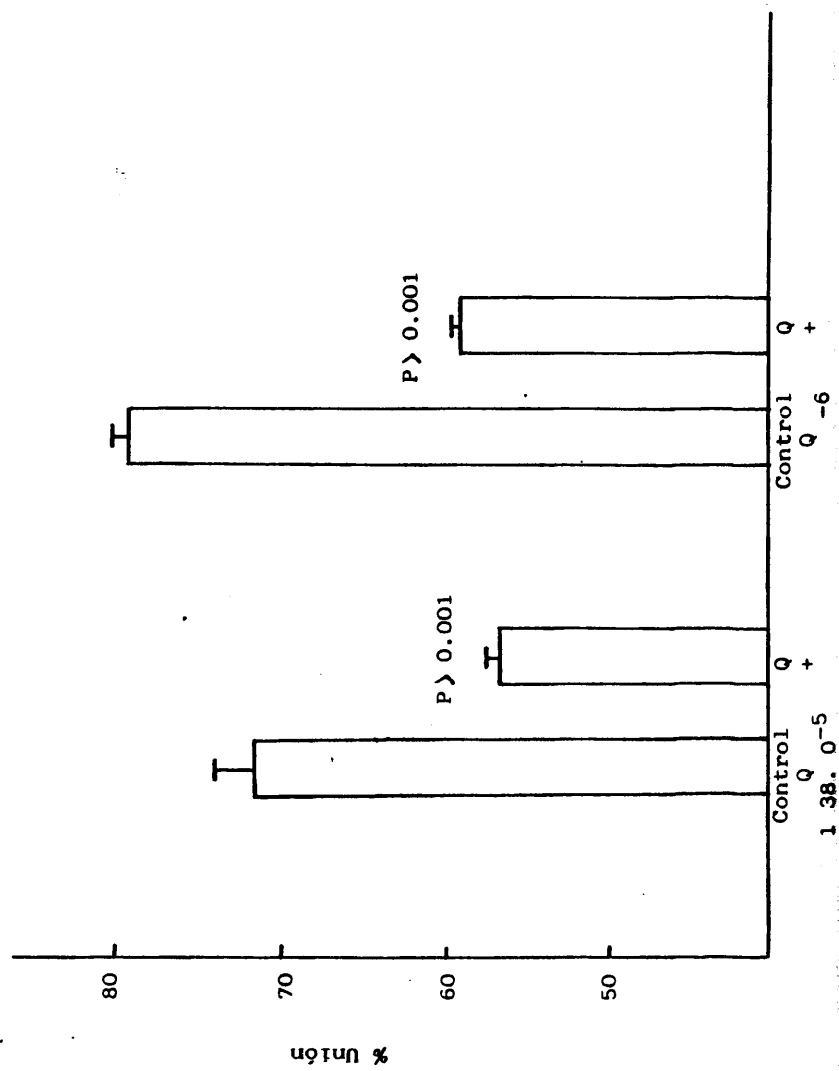


TABLA XXIX.- INTERACCION DE LA OXITETRACICLINA (OTC) A CONCENTRACION DE $2,39.10^{-4}M$ SOBRE LA UNION DE LA QUINIDINA A CONCENTRACIONES DE $1,38.10^{-5}M$ y $5,50.10^{-6}M$ A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión de quinidina	% Unión de quinidina en presencia de OTC	Valor medio \bar{U}	Desviación standard (DS)	Error standard de la media (ESM)
OTC $2,39.10^{-4}M$ Quinidina $1,38.10^{-5}M$	71,57	65,01 61,03 59,45 60,44 64,55 58,99 63,56 62,97	62,00	2,32	0,82
OTC $2,39.10^{-4}M$ Quinidina $5,50.10^{-6}M$	79,00	62,50 70,00 65,00 67,50 72,50 67,50 67,50 67,50	67,50	2,98	1,06

Los resultados demuestran que la oxitetraciclina a concentración de $2,39.10^{-4}M$ desplaza un valor de 9,57 en el porcentaje de unión de la quinidina ($1,38.10^{-5}M$) a la seroalbúmina bovina. Similarmente la oxitetraciclina origina un mayor desplazamiento en la unión de la quinidina ($5,50.10^{-6}M$) a la seroalbúmina bovina, siendo el valor encontrado 11,50. Los valores medios de esta Tabla XXIX vienen representados en la Fig. 38 con el cálculo estadístico correspondiente para el estudio de su significación (análisis de varianza, t de Student).

Fig. 38.- INTERACCION DE LA OXITETRACICLINA (OTC) A CONCENTRACION DE $2,39.10^{-4}M$ SOBRE LA UNION DE LA QUINIDINA (Q) A CONCENTRACIONES DE $1,38.10^{-5}M$ Y $5,50.10^{-6}M$ A LA SEROALBUMINA BOVINA

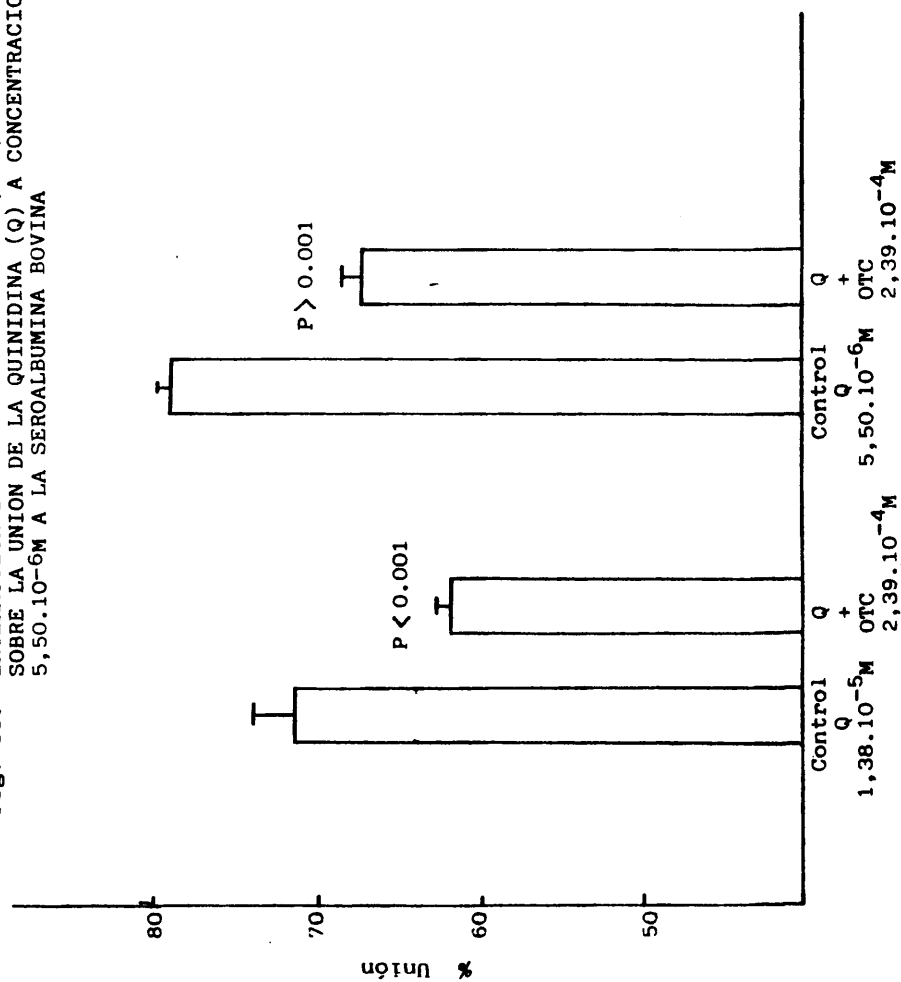


TABLA XXX.- INTERACCION DE LA TETRACICLINA (TCC) A CONCENTRACION DE $2,47 \cdot 10^{-4}M$ SOBRE LA UNION DE LA QUINIDINA A CONCENTRACIONES DE $1,38 \cdot 10^{-5}M$ y $5,50 \cdot 10^{-6}M$ A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión quinidina	% Unión de quinidina en presencia de TCC	Valor medio \bar{U}	Desviación standard (DS)	Error standard de la media (ESM)
TCC $2,47 \cdot 10^{-4}M$ Quinidina $1,38 \cdot 10^{-5}M$	71,57	64,00 62,00 58,00 58,00 62,36 58,14 58,64 62,86	60,50	2,53	0,90
TCC $2,47 \cdot 10^{-4}M$ Quinidina $5,50 \cdot 10^{-6}M$	79,00	66,96 70,66 69,73 67,03 66,27 69,04 65,34 68,97	68,00	1,85	0,66

Los resultados demuestran que la tetraciclina a concentración de $2,47 \cdot 10^{-4}M$ desplaza un valor de 11,07 en el porcentaje de unión de la quinidina ($1,38 \cdot 10^{-5}M$) a la seroalbúmina bovina. Similarmente la tetraciclina origina un igual desplazamiento en la unión de la quinidina ($5,50 \cdot 10^{-6}M$) a la seroalbúmina bovina, siendo el valor encontrado de 11,00. Los valores medios de esta Tabla XXX vienen representados en la Fig. 39 con el cálculo estadístico correspondiente para el estudio de su significación (análisis de varianza, t de Student).

Fig. 39.- INTERACCION DE LA TETRACICLINA (TCC) A CONCENTRACION DE $2,47 \cdot 10^{-4}M$ SOBRE LA UNION DE QUINIDINA (Q) A CONCENTRACIONES DE $1,38 \cdot 10^{-5}M$ Y $5,50 \cdot 10^{-6}M$ A LA SEROALBUMINA BOVINA

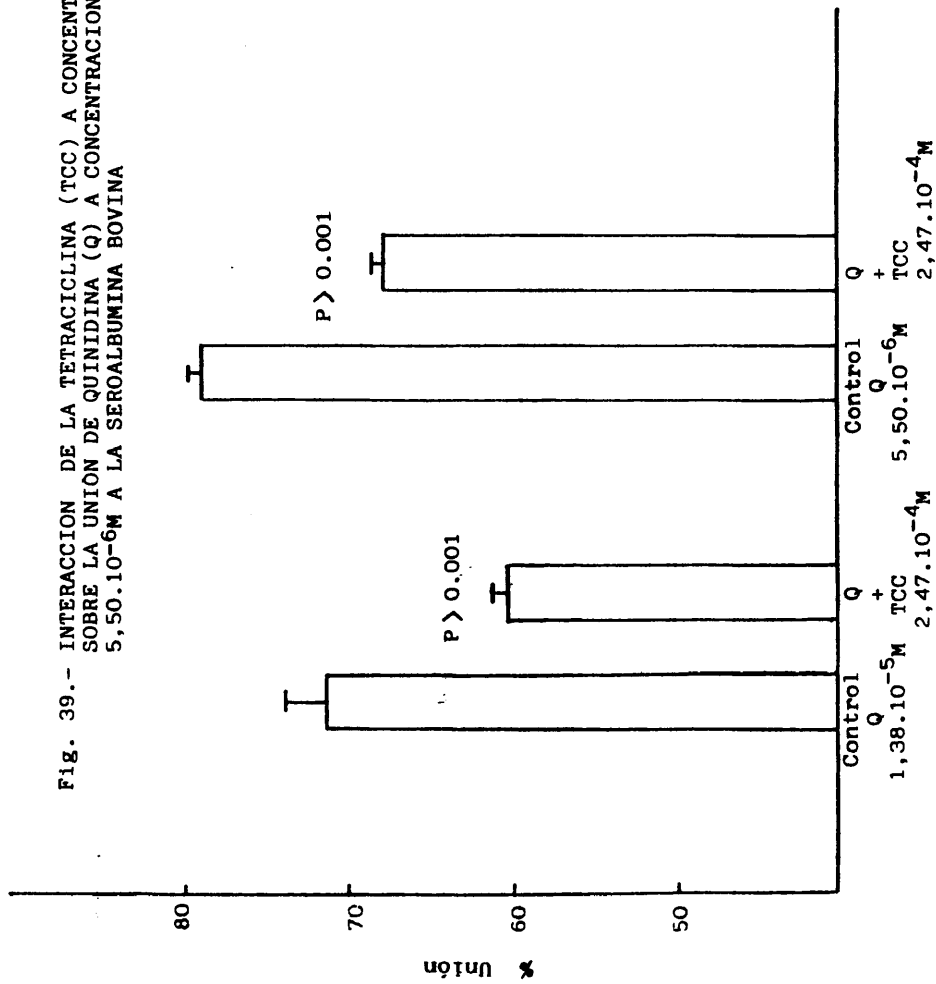


TABLA XXXI.- DESPLAZAMIENTO ORIGINADO POR UNA SERIE DE TETRACICLINAS SOBRE LA UNIÓN DE LA QUINIDINA
A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Quinidina	Desplazamiento por tetraciclinas				
	CTC ($2,29.10^{-4}M$)	DMTC ($2,36.10^{-4}M$)	MNC ($2,40.10^{-4}M$)	OTC ($2,39.10^{-4}M$)	TCC ($2,47.10^{-4}M$)
Quinidina ($1,38.10^{-5}M$)	16,24	13,37	14,82	9,57	11,07
Quinidina ($5,50.10^{-6}M$)	20,87	21,50	19,68	11,50	11,00

Los resultados observados señalan que los desplazamientos máximos originados por las tetraciclinas sobre la unión de la quinidina a la seroalbúmina bovina son provocados por la clortetraciclina, la demetilclortetraciclina, y la minociclina.

3.5.- Unión del 1-propranolol-³H a la seroalbúmina bovina.

Se ha realizado un estudio de la unión del 1-propranolol-³H a la seroalbúmina bovina por precipitación con ClO₄H.

Se ha empleado un análisis radiométrico para valorar el 1-propranolol-³H.

Las concentraciones estudiadas del 1-propranolol-³H fueron:

- 0,06.10⁻⁵M
- 0,20.10⁻⁵M
- 0,33.10⁻⁵M
- 0,67.10⁻⁵M
- 0,94.10⁻⁵M
- 1,35.10⁻⁵M
- 2,03.10⁻⁵M
- 2,71.10⁻⁵M
- 3,38.10⁻⁵M

Los resultados se expresan en las Tablas XXXII y XXXIII y gráficas 40 y 41.

TABLA XXXII.- UNION DEL L-PROPRANOLOL-³H A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión	Valor medio (\bar{U})	Desviación standar (DS)	Error standard de la media (ESM)
0,06.10 ⁻⁵ M	54,55 53,55 54,67 55,63	54,60	0,84	0,42
0,20.10 ⁻⁵ M	53,51 51,85 51,02 51,52	51,98	1,07	0,54
0,33.10 ⁻⁵ M	50,19 49,38 48,03 48,42	49,00	0,97	0,49
0,67.10 ⁻⁵ M	49,72 48,75 48,63 47,70	48,70	0,82	0,41
0,94.10 ⁻⁵ M	48,51 47,56 49,66 48,67	48,60	0,86	0,43
1,35.10 ⁻⁵ M	48,39 49,49 48,49 47,43	48,45	0,84	0,42
2,03.10 ⁻⁵ M	46,95 47,92 49,07 48,06	48,00	0,86	0,43
2,71.10 ⁻⁵ M	47,40 48,53 46,41 47,50	47,46	0,86	0,43

Continuación Tabla XXXII.

Concentración	% Unión	Valor medio (\bar{U})	Desviación standard (DS)	Error standard de la medi (ESM)
$3,38 \cdot 10^{-5} M$	47,39	47,45	0,84	0,42
	48,48			
	46,40			
	47,53			

La representación gráfica de esta Tabla viene dada en la Figura 40. Los resultados señalan que el mayor porcentaje de unión de 1-propranolol- 3H a la seroalbúmina bovina se alcanza a la concentración de $0,06 \cdot 10^{-5} M$.

TABLA XXXIII.- UNION DEL 1-PROPRANOLOL-³H A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión	r	M	r/M . 10 ³
0,06.10 ⁻⁵ M	54,60	0,0005591	0,0000003	1,864
0,2 .10 ⁻⁵ M	51,98	0,0015682	0,0000009	1,742
0,33.10 ⁻⁵ M	49,00	0,0024553	0,0000017	1,444
0,67.10 ⁻⁵ M	48,70	0,0048805	0,0000034	1,435
0,94.10 ⁻⁵ M	48,60	0,0068075	0,0000048	1,418
1,35.10 ⁻⁵ M	48,45	0,0097110	0,0000069	1,407
2,03.10 ⁻⁵ M	48,00	0,0144043	0,0000105	1,372
2,71.10 ⁻⁵ M	47,46	0,0190252	0,0000142	1,340
3,38.10 ⁻⁵ M	47,45	0,0237549	0,0000178	1,335

siendo:

r : relación entre moles de fármaco unido a aseroalbúmina bovina y moles totales de proteína.

M : concentración del medicamento libre.

La representación gráfica de esta Tabla (Fig. 41) indica que al menos existen dos clases de puntos de unión. Las constantes de asociación (K_1, K_2) y el número de sitios de unión (N_1, N_2) para cada clase son:

$$\begin{aligned} K_1 &= 2,2 \cdot 10^5 & N_1 &= 0,0092 \\ K_2 &= 5,6 \cdot 10^3 & N_2 &= 0,26 \end{aligned}$$

Las ecuaciones de las respectivas rectas de regresión lineal (y_1, y_2) y los coeficientes de correlación (r_1, r_2) vienen expresados en la Fig. 41.

Fig. 40.- UNION DE L-PROPRANOLOL-³H A LA SEROALBUMINA BOVINA.

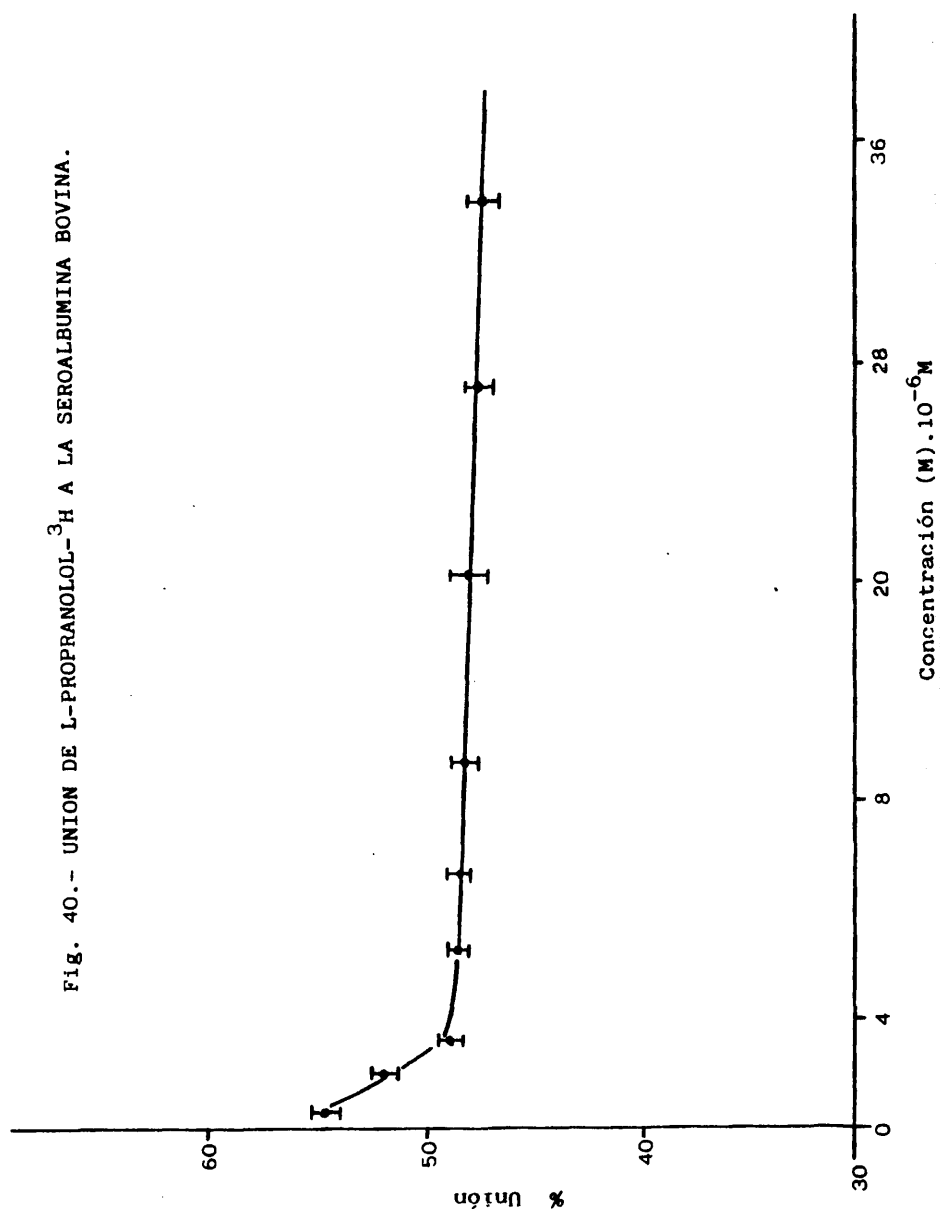
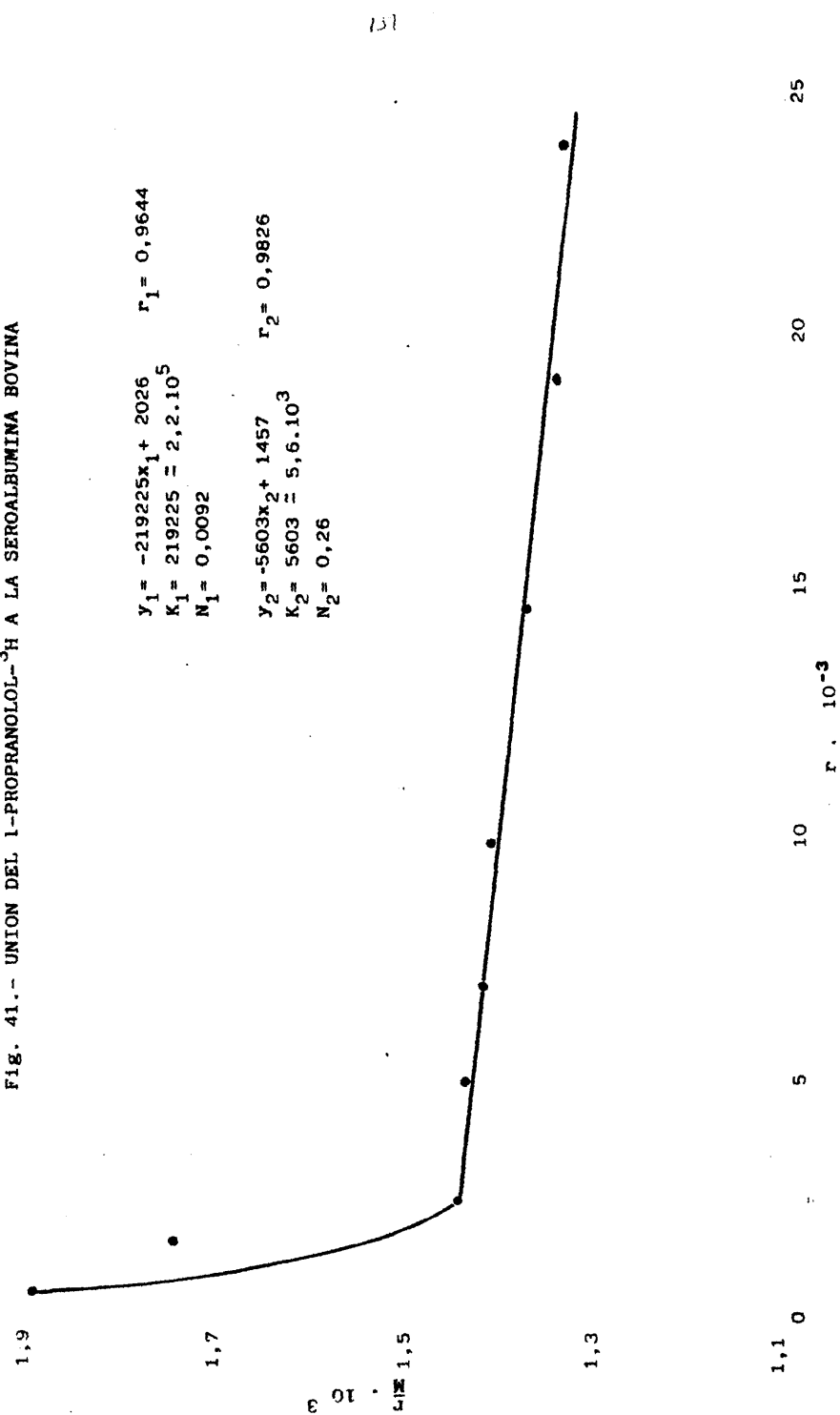


Fig. 41.- UNION DEL 1-PROPRANOLOL-³H A LA SEROALBUMINA BOVINA



3.6.- Interacción de 1-propranolol-³H sobre la unión de una serie de tetraciclinas a la seroalbúmina bovina.

Se estudia la interacción de 1-propranolol-³H a las concentraciones de:

- 2,71 . 10⁻⁵M
- 0,67 . 10⁻⁵M
- 0,33 . 10⁻⁵M
- 0,20 . 10⁻⁵M
- 0,06 . 10⁻⁵M

elegidas por estar dentro del rango terapéutico sobre la unión de una serie de tetraciclinas a la seroalbúmina bovina.

Las tetraciclinas estudiadas fueron:

- Clortetraciclina a concentración de 2,29.10⁻⁴M
- Demetilclortetraciclina a concentración de 2,36.10⁻⁴M
- Minociclina a concentración de 2,40.10⁻⁴M
- Oxitetraciclina a concentración de 2,39.10⁻⁴M
- Tetraciclina a concentración de 2,47.10⁻⁴M

Los resultados encontrados para la interacción de 1-propranolol-³H sobre la unión de la clortetraciclina a la seroalbúmina bovina se expresan en la Tabla XXXIV y gráfica 42.

Los resultados encontrados para la interacción de 1-propranolol-³H sobre la unión de la demetilclortetraciclina a la seroalbúmina bovina se expresan en la Tabla XXXV y gráfica 43.

Los resultados encontrados para la interacción de 1-propranolol-³H sobre la unión de la minociclina a la seroalbúmina bovina se expresan en la Tabla XXXVI y gráfica 44.

Los resultados encontrados para la interacción de 1-propranolol-³H sobre la unión de la oxitetraciclina a la seroalbúmina bovina se expresan en la Tabla XXXVII y gráfica 45.

Los resultados encontrados para la interacción de 1-propranolol-³H sobre la unión de la tetraciclina a la seroalbúmina bovina se expresan en la Tabla XXXVIII y gráfica 46.

Como conclusión la Tabla XXXIX recoge los valores del desplazamiento originado por el 1-propranolol-³H sobre la unión de una serie de tetraciclinas a la seroalbúmina bovina.

TABLA XXXIV.- INTERACCION DE 1-PROPRANOLOL-³H SOBRE LA UNION DE
LA CLORTETRACICLINA (CTC) A CONCENTRACION DE
2,29.10⁻⁴M A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión CTC	% Unión CTC en presencia 1-proprano- lol- ³ H	Valor medio U	Desviacion standard (DS)	Error stan- dard de la media (ESM)
CTC 2,29.10 ⁻⁴ M 1-proprano- lol- ³ H 2,71.10 ⁻⁵ M	92,62	61,61 60,66 59,54 60,55	60,59	0,84	0,42
CTC 2,29.10 ⁻⁴ M 1-proprano- lol- ³ H 0,67.10 ⁻⁵ M	92,62	73,80 73,54 72,03 72,47	72,96	0,84	0,42
CTC 2,29.10 ⁻⁴ M 1-proprano- lol- ³ H 0,33.10 ⁻⁵ M	92,62	70,90 69,90 69,84 68,80	69,86	0,83	0,43
CTC 2,29.10 ⁻⁴ M 1-proprano- lol- ³ H 0,20.10 ⁻⁵ M	92,62	67,62 67,49 67,63 67,47	67,55	0,10	0,05
CTC 2,29.10 ⁻⁴ M 1-proprano- lol- ³ H 0,06.10 ⁻⁵ M	92,62	67,64 67,49 67,60 67,47	67,55	0,10	0,05

Los resultados demuestran que el 1-propranolol-³H a concentración de 2,71.10⁻⁵M desplaza un valor de 32,03 en el porcentaje de unión de la clortetraciclina a la seroalbúmina bovina. Las restantes concentraciones estudiadas de 1-propranolol-³H también originan una disminución pero menor en el porcentaje de unión de la clortetra-

ciclina. Los valores de los desplazamientos encontrados fueron:

- 1-propranolol-³H ($0,06 \cdot 10^{-5}M$) desplaza un valor de 25,07 en el porcentaje de unión de la clortetraciclina.
- 1-propranolol-³H ($0,20 \cdot 10^{-5}M$) desplaza un valor de 25,07
- 1-propranolol-³H ($0,33 \cdot 10^{-5}M$) desplaza un valor de 22,76
- 1-propranolol-³H ($0,67 \cdot 10^{-5}M$) desplaza un valor de 19,66.

Los valores medios de esta Tabla XXXIV vienen representados en la Fig. 42, con el cálculo estadístico correspondiente para el estudio de su significación (análisis de varianza, t de Student).

Fig. 42.- INTERACCION DEL 1-PROPRANOLOL-³H A DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE LA UNION DE LA CLORTETRACICLINA (CTC) A LA SEROALBUMINA BOVINA.

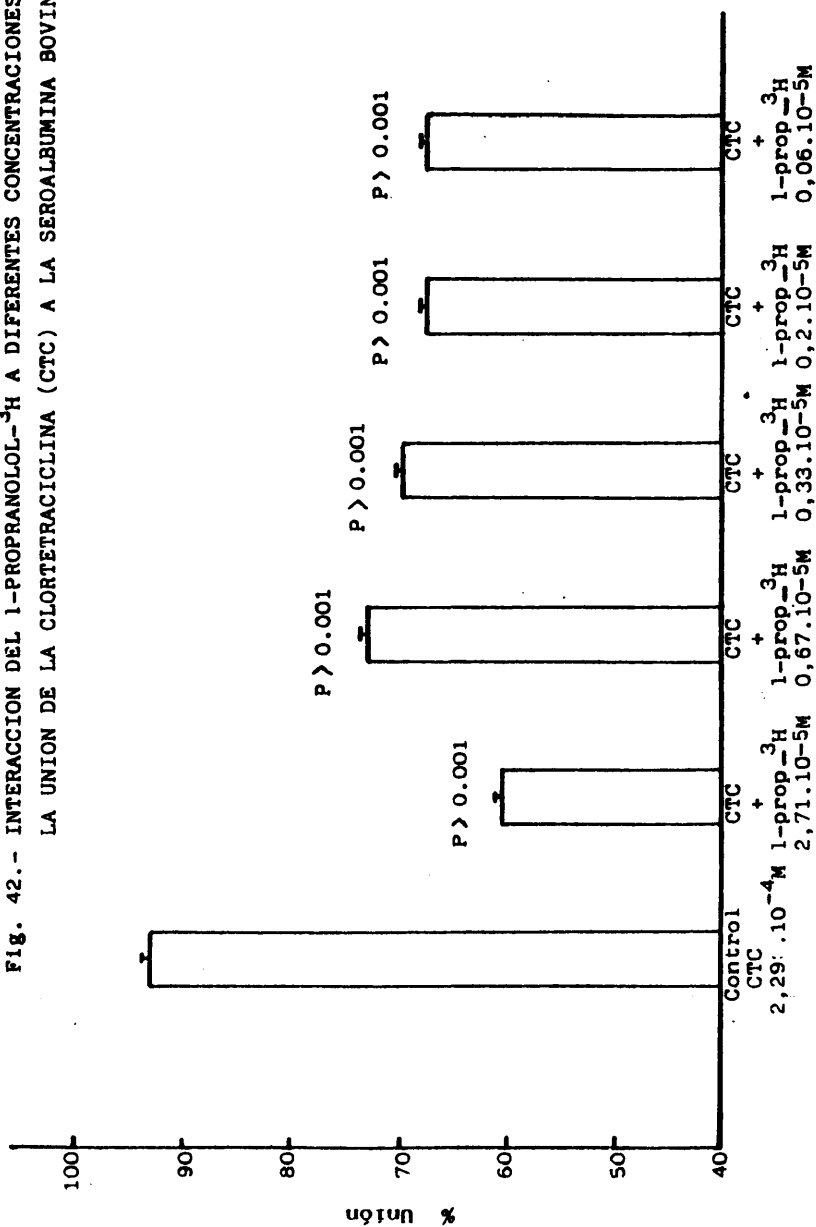


TABLA XXXV.- INTERACCION DE 1-PROPANOLOL-³H SOBRE LA UNION DE LA
DEMETILCLORTETRACICLINA (DMCTC) A CONCENTRACION DE
 $2,36.10^{-4}$ M A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión DMCTC	% unión DMCTC en presencia de 1-proprano- 1ol- ³ H	Valor medio \bar{U}	Desviación standard (DS)	Error stan- dard de la media (ESM)
DMCTC $2,36.10^{-4}$ M 1-proprano- 1ol- ³ H $2,71.10^{-5}$ M	89,54	77,17 76,23 76,02 75,14	76,14	0,83	0,42
DMCTC $2,36.10^{-4}$ M 1-proprano- 1ol- ³ H $0,67.10^{-5}$ M	89,54	73,01 73,93 72,83 71,91	72,92	0,82	0,41
DMCTC $2,36.10^{-4}$ M 1-proprano- 1ol- ³ H $0,33.10^{-5}$ M	89,54	62,12 61,93 62,97 60,98	62,00	0,81	0,41
DMCTC $2,36.10^{-4}$ M 1-proprano- 1ol- ³ H $0,20.10^{-5}$ M	89,54	63,80 64,74 63,63 62,75	63,73	0,81	0,41
DMCTC $2,36.10^{-4}$ M 1-proprano- 1ol- ³ H $0,06.10^{-5}$ M	89,54	69,01 69,05 69,15 69,15	69,09	0,06	0,03

Los resultados demuestran que el 1-propranolol-³H a concentración de $0,33.10^{-5}$ M origina el mayor desplazamiento en el porcentaje de unión de la demetilclortetraciclina a la seroalbúmina bovina siendo el valor 27,54. Las restantes concentraciones estudiadas del 1-propranolol-³H también originan una disminución del porcentaje de unión de

la demetilclortetraciclina a la seroalbúmina bovina. Los valores de los desplazamientos encontrados fueron:

1-propranolol-³H ($0,20 \cdot 10^{-5}$ M) desplaza un valor de 25,81 en el porcentaje de unión de la demetilclortetraciclina.

1-propranolol-³H ($0,06 \cdot 10^{-5}$ M) desplaza un valor de 20,45

1-propranolol-³H ($0,67 \cdot 10^{-5}$ M) desplaza un valor de 16,62

1-propranolol-³H ($2,71 \cdot 10^{-5}$ M) desplaza un valor de 13,40

Los valores medios de esta Tabla XXXV vienen representados en la Fig. 43 con el cálculo estadístico correspondiente para el estudio de su significación (análisis de varianza, t de Student).

Fig. 43.- INTERACCION DEL L-PROPRANOLOL- ^3H A DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE LA UNION DE LA DEMETILCLORTETRACICLINA (DMCTC) A LA SEROALBUMINA BOVINA.

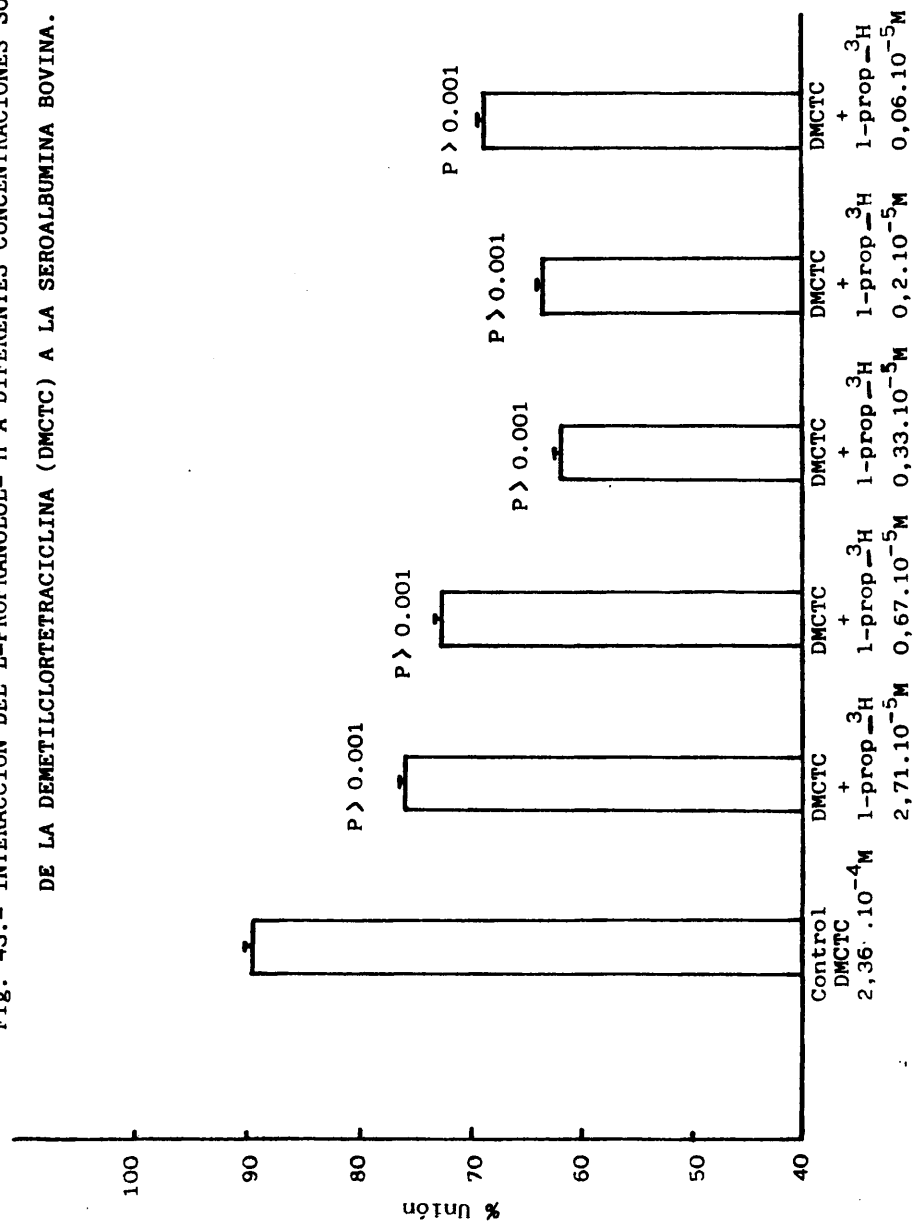


TABLA XXXVI. INTERACCION DE 1-PROPRANOLOL-³H SOBRE LA UNION DE LA MINOCICLINA (MNC) A LA CONCENTRACION DE $2,40 \cdot 10^{-4}$ M A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión MNC	% Unión MNC en presencia 1-propranolol- ³ H	Valor medio \bar{U}	Desviación standard (DS)	Error stand de la media (ESM)
MNC $2,40 \cdot 10^{-4}$ M 1-propranolol- ³ H $2,71 \cdot 10^{-5}$ M	90,46	49,98 48,95 47,99 49,08	49,00	0,81	0,41
MNC $2,40 \cdot 10^{-4}$ M 1-propranolol- ³ H $0,67 \cdot 10^{-5}$ M	90,46	53,28 53,31 53,44 53,41	53,36	0,10	0,05
MNC $2,40 \cdot 10^{-4}$ M 1-propranolol- ³ H $0,33 \cdot 10^{-5}$ M	90,46	28,53 26,45 27,59 27,43	27,50	0,84	0,42
MNC $2,40 \cdot 10^{-4}$ M 1-propranolol- ³ H $0,20 \cdot 10^{-5}$ M	90,46	49,74 49,76 49,59 49,63	49,68	0,10	0,05
MNC $2,40 \cdot 10^{-4}$ M 1-propranolol- ³ H $0,06 \cdot 10^{-5}$ M	90,46	45,81 44,81 43,75 44,71	44,77	0,84	0,42

Los resultados demuestran que el 1-propranolol-³H a concentración de $0,33 \cdot 10^{-5}$ M origina el mayor desplazamiento en el porcentaje de unión de la minociclina a la seroalbúmina bovina con un valor de 62,96. Las restantes concentraciones estudiadas del 1-propranolol-³H también originan una disminución del porcentaje de unión de la mino-

ciclina. Los valores de los desplazamientos encontrados fueron:

- 1-propranolol-³H ($0,06 \cdot 10^{-5} \text{M}$) desplaza un valor de 45,69 en el porcentaje de unión de la minociclina
- 1-propranolol-³H ($2,71 \cdot 10^{-5} \text{M}$) desplaza un valor de 41,46
- 1-propranolol-³H ($0,20 \cdot 10^{-5} \text{M}$) desplaza un valor de 40,78
- 1-propranolol-³H ($0,67 \cdot 10^{-5} \text{M}$) desplaza un valor de 37,10

Los valores medios de esta Tabla XXXVI vienen representados en la Fig. 44 con el cálculo estadístico correspondiente para el estudio de su significación (análisis de varianza, t de Student).

Fig. 44.- INTERACCION DEL 1-PROPRANOLOL- ^3H A DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE LA UNION DE LA MINOCICLINA (MNC) A LA SEROALBUMINA BOVINA.

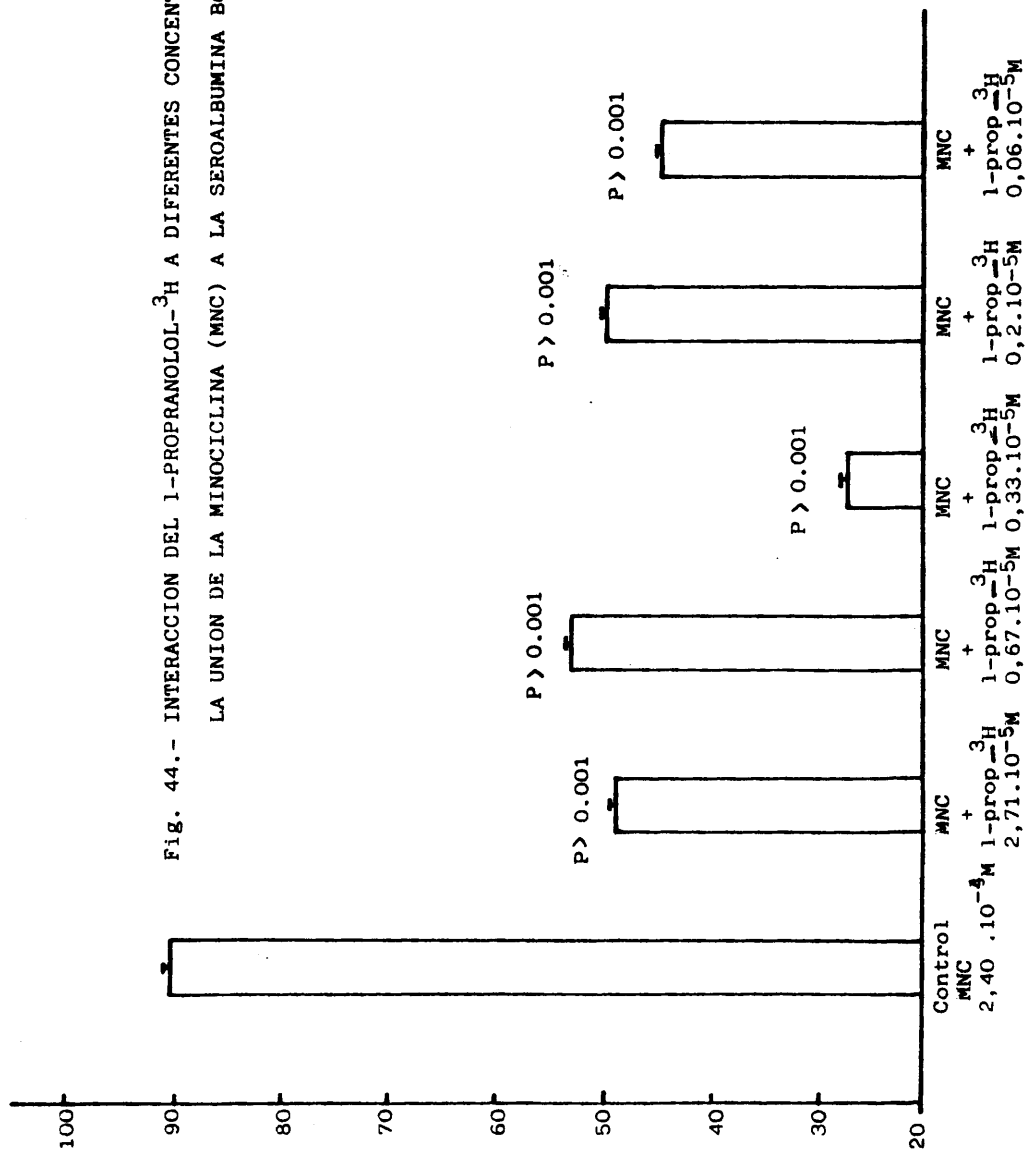


TABLA XXXVII.- INTERACCION DE 1-PROPRANOLOL-³H SOBRE LA UNIÓN DE LA OXITETRACICLINA (OTC) A LA CONCENTRACION DE 2,39.10⁻⁴M A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión OTC	% Unión de OTC en presencia de 1-propranolol- ³ H	Valor medio \bar{U}	Desviación standard (DS)	Error standard de la media (ESM)
OTC 2,39.10 ⁻⁴ M 1-propranolol- ³ H 2,71.10 ⁻⁵ M	96,54	69,02 69,90 71,01 70,07	70,00	0,81	0,41
OTC 2,39.10 ⁻⁴ M 1-propranolol- ³ H 0,67.10 ⁻⁵ M	96,54	56,35 56,41 56,41 56,27	56,36	0,06	0,03
OTC 2,39.10 ⁻⁴ M 1-propranolol- ³ H 0,33.10 ⁻⁵ M	96,54	56,97 58,07 56,05 57,11	57,05	0,82	0,41
OTC 2,39.10 ⁻⁴ M 1-propranolol- ³ H 0,20.10 ⁻⁵ M	96,54	55,79 55,73 55,90 55,86	55,82	0,06	0,03
OTC 2,39.10 ⁻⁴ M 1-propranolol- ³ H 0,06.10 ⁻⁵ M	96,54	71,37 70,39 71,47 72,41	71,41	0,82	0,41

Los resultados demuestran que el 1-propranolol-³H a concentración de 0,20.10⁻⁵M origina el mayor desplazamiento en el porcentaje de unión de la oxitetraciclina a la seroalbúmina bovina con un valor de 40,72. Las restantes concentraciones estudiadas del 1-propranolol-³H también originan una disminución del porcentaje de unión de

la oxitetraciclina. Los valores de los desplazamientos encontrados fueron:

1-propranolol-³H ($0,67 \cdot 10^{-5}M$) desplaza un valor de 40,18 en el porcentaje de unión de la oxitetraciclina.

1-propranolol-³H ($0,33 \cdot 10^{-5}M$) desplaza un valor de 39,49

1-propranolol-³H ($2,71 \cdot 10^{-5}M$) desplaza un valor de 26,54

1-propranolol-³H ($0,06 \cdot 10^{-5}M$) desplaza un valor de 25,13

Los valores medios de esta Tabla XXXVII vienen representados en la Fig. 45 con el cálculo estadístico correspondiente para el estudio de su significación (análisis de varianza, t de Student).

Fig. 45.- INTERACCION DEL 1-PROPRANOLOL-³H A DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE LA UNION DE LA OXITETRACICLINA (OTC) A LA SEROALBUMINA BOVINA.

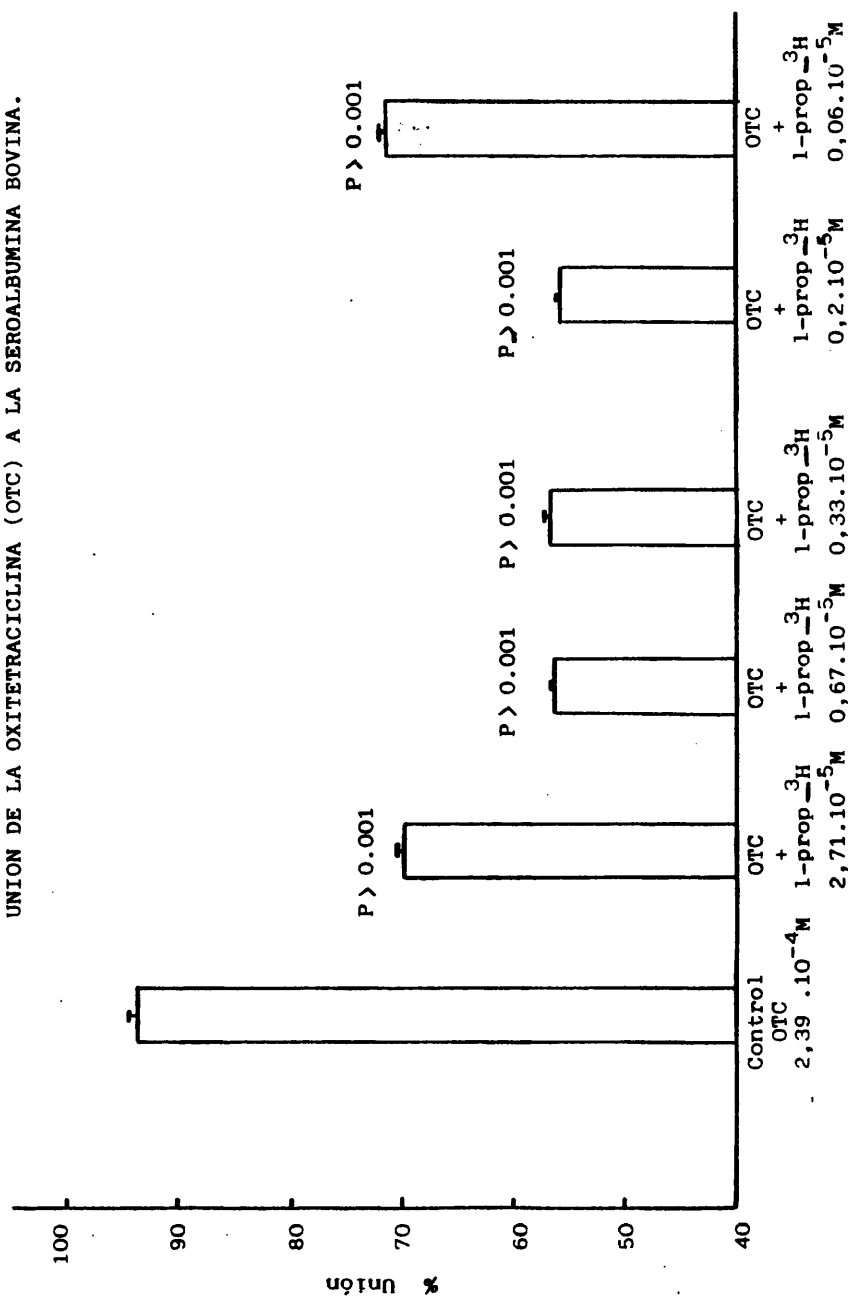


TABLA XXXVIII.- INTERACCION DE L-PROPRANOLOL-³H SOBRE LA UNIÓN DE LA TETRACICLINA (TTC) A LA CONCENTRACION DE $2,47.10^{-4}$ M A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración	% Unión TTC	% Unión TTC en presencia l-proprano- lol- ³ H	Valor medio ū	Desviación standard (DS)	Error stan- dard de la media (ESM)
TTC $2,47.10^{-4}$ M l-proprano- lol- ³ H $2,71.10^{-5}$ M	89,00	69,07 69,13 69,00 69,16	69,09	0,10	0,05
TTC $2,47.10^{-4}$ M l-proprano- lol- ³ H $0,67.10^{-5}$ M	89,00	68,33 69,24 70,34 69,37	69,32	0,82	0,41
TTC $2,47.10^{-4}$ M l-proprano- lol- ³ H $0,33.10^{-5}$ M	89,00	66,82 65,84 66,91 67,87	66,86	0,83	0,42
TTC $2,47.10^{-4}$ M l-proprano- lol- ³ H $0,20.10^{-5}$ M	89,00	65,72 65,67 65,58 65,59	65,64	0,10	0,05
TTC $2,47.10^{-4}$ M l-proprano- lol- ³ H $0,06.10^{-5}$ M	89,00	65,70 65,55 65,67 65,64	65,64	0,06	0,05

Los resultados demuestran que el l-propranolol-³H a concentraciones de $0,20.10^{-5}$ M y $0,06.10^{-5}$ M originan los mayores desplazamientos en el porcentaje de unión de la tetraciclina a la seroalbúmina bovina con un valor igual en ambos casos de 23,36. Las restantes concentraciones estudiadas de l-propranolol-³H también originan una disminu-

ción del porcentaje de unión de la tetraciclina. Los valores de los desplazamientos encontrados fueron:

1-propranolol-³H ($0,33 \cdot 10^{-5}M$) desplaza un valor de 22,14 en el porcentaje de unión de la tetraciclina

1-propranolol-³H ($2,71 \cdot 10^{-5}M$) desplaza un valor de 19,91

1-propranolol-³H ($0,67 \cdot 10^{-5}M$) desplaza un valor de 19,68.

Los valores medios de esta Tabla XXXVIII vienen representados en la Fig. 46 con el cálculo estadístico correspondiente para el estudio de su significación (análisis de varianza, t de Student).

Fig. 46.- INTERACCION DEL 1-PROPANOLOL- ^3H A DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE LA UNION DE LA TETRACICLINA (TCC) A LA SEROALBUMINA BOVINA.

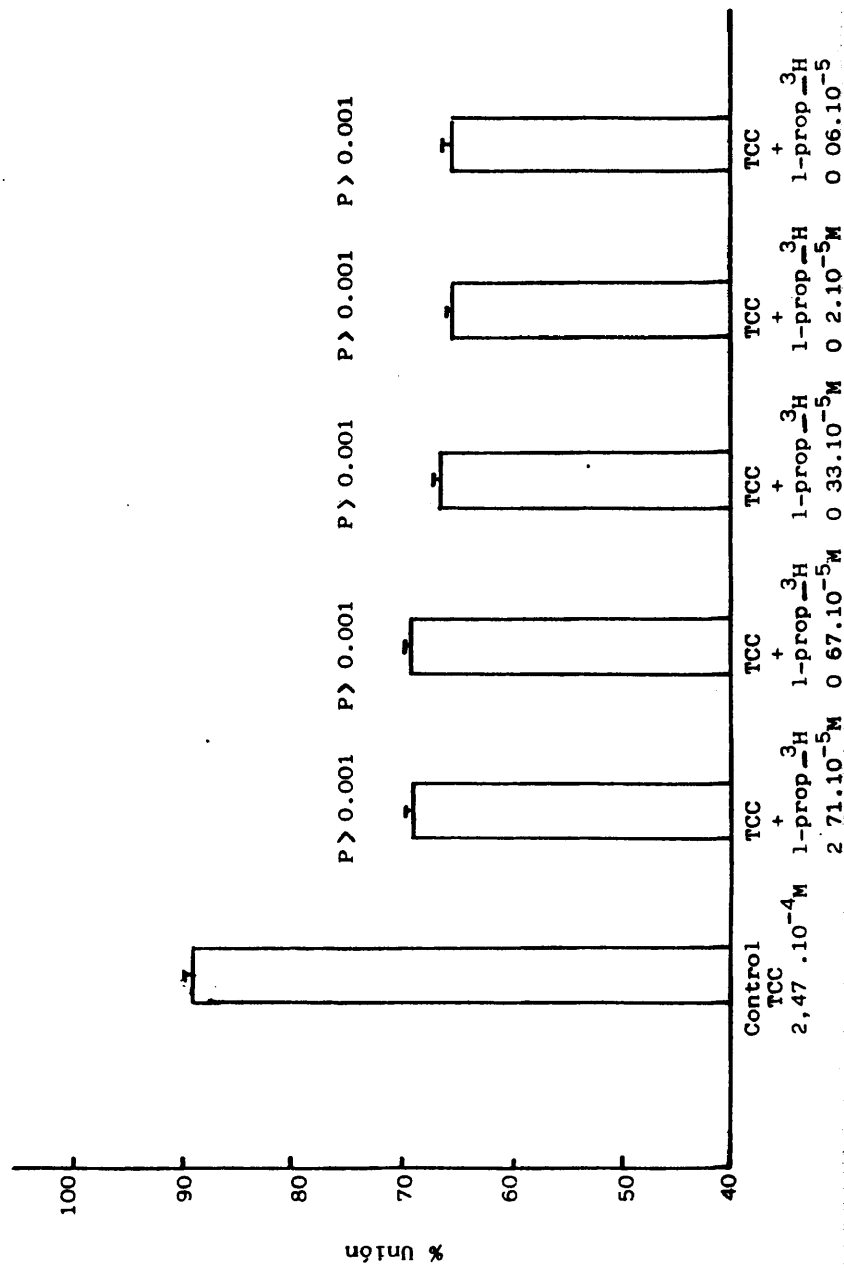


TABLA XXXIX.- DESPLAZAMIENTO ORIGINADO POR EL 1-PROPRANOLOL-³H A DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE LA UNION DE UNA SERIE DE TETRACICLINAS A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Tetraciclina	Desplazamiento por 1-propranolol- ³ H				
	(2,71.10 ⁻⁵ M)	(0,67.10 ⁻⁵ M)	(0,33.10 ⁻⁵ M)	(0,20.10 ⁻⁵ M)	(0,06.10 ⁻⁵ M)
Clortetraciclina (2,29.10 ⁻⁴ M)	32,03	19,66	22,76	25,07	25,07
Demetilclortetraciclina (2,36.10 ⁻⁴ M)	13,40	16,62	27,54	25,81	20,45
Minociclina (2,40.10 ⁻⁴ M)	41,46	37,10	62,96	40,78	45,69
Oxitetraciclina (2,39.10 ⁻⁴ M)	26,54	40,18	39,49	40,72	25,13
Tetraiciclina (2,47.10 ⁻⁴ M)	19,91	19,68	22,14	23,36	23,36

-170-

Los resultados observados señalan que el 1-propranolol-³H desplaza significativamente a todos los antibióticos estudiados destacandose el desplazamiento con la minociclina.

3.7. Interacción de una serie de tetraciclinas sobre la unión del 1-propranolol-³H a la seroalbúmina bovina.

Se estudia la interacción de una serie de tetraciclinas a concentraciones de:

- clortetraciclina a concentración $2,29 \cdot 10^{-4} \text{M}$.
- demetilclortetraciclina a concentración de $2,36 \cdot 10^{-4} \text{M}$.
- minociclina a concentración de $2,40 \cdot 10^{-4} \text{M}$.
- oxitetraciclina a concentración de $2,39 \cdot 10^{-4} \text{M}$.
- tetraciclina a concentración de $2,47 \cdot 10^{-4} \text{M}$.

sobre la unión a la seroalbúmina bovina del 1-propranolol-³H a concentraciones de:

- $2,71 \cdot 10^{-5} \text{M}$
- $0,67 \cdot 10^{-5} \text{M}$
- $0,33 \cdot 10^{-5} \text{M}$
- $0,20 \cdot 10^{-5} \text{M}$
- $0,06 \cdot 10^{-5} \text{M}$

Los resultados encontrados para la interacción de clortetraciclina sobre la unión del 1-propranolol-³H a la seroalbúmina bovina se expresan en las Tablas XL y XLI y gráficas 47 y 48.

Los resultados encontrados para la interacción de la demetilclortetraciclina sobre la unión del 1-propranolol-³H a la seroalbúmina bovina se expresan en las tablas XLII y XLIII y gráficas 49 y 50.

Los resultados encontrados para la interacción de la minociclina sobre la unión del 1-propranolol-³H a la seroalbúmina bovina se expresan en las tablas XLIV y XLV y gráficas 51 y 52.

Los resultados encontrados para la interacción de la oxitetraciclina sobre la unión del 1-propranolol-³H a la seroalbúmina bovina se expresan en las tablas XLVI y XLVII y gráficas 53 y 54.

Los resultados encontrados para la interacción de la tetraciclina sobre la unión del 1-propranolol-³H a la seroalbúmina bovina se expresan en las tablas XLVIII y IL y gráficas 55 y 56.

TABLA XL.- INTERACCION DE LA CLORTETRACICLINA (CTC) A CONCENTRACION DE $2,29.10^{-4}M$ SOBRE LA UNION DEL L-PROPRANOLOL- 3H A LA SEROALBUMINA BOVINA

Concentración l-proprano- lol- 3H	% Unión l-propra- nolol- 3H . Valor medio	% Unión l-pro- pranolol- 3H en presencia de CTC. Valor me- dio.	Desviación standard	Error standard de la media
	(\bar{U})	(\bar{U})	(DS)	(ESM)
$2,71.10^{-5}M$	47,46	41,35	1,05	0,50
$0,67.10^{-5}M$	48,70	47,50	0,76	0,27
$0,33.10^{-5}M$	49,00	48,65	1,18	0,42
$0,20.10^{-5}M$	51,98	50,54	0,80	0,31
$0,06.10^{-5}M$	54,60	53,35	0,84	0,33

Los resultados son valores medios de 4 experimentos.

Los resultados demuestran que la clortetraciclina a concentración de $2,29.10^{-4}M$ origina un desplazamiento en el porcentaje de unión del l-propranolol- 3H a la seroalbúmina bovina.

El mayor desplazamiento observado fue para el caso del l-propranolol- 3H a concentración de $2,71.10^{-5}M$, siendo el valor del desplazamiento de 6,11.

Los porcentajes de unión del l-propranolol- 3H a la seroalbumina bovina y los porcentajes de unión del l-propranolol- 3H en presencia de clortetraciclina a la seroalbúmina bovina vienen representados en la figura 47. Como se observa en la gráfica el mayor desplazamiento que origina la clortetraciclina es para el l-propranolol- 3H a concentración de $2,71.10^{-5}M$ desplazandose de un 47,46% a un valor de 41,35%.

TABLA XLI.- UNION DEL L-PROPRANOLOL-³H A LA.SEROALBUMINA BOVINA
EN PRESENCIA DE CLORTETRACICLINA ($2,29 \cdot 10^{-4}M$)

Concentración	% Unión	r	M	r/M . 10^3
$2,71 \cdot 10^{-5}M$	41,35	0,0165435	0,0000159	1,043
$0,67 \cdot 10^{-5}M$	47,50	0,0047600	0,0000035	1,360
$0,33 \cdot 10^{-5}M$	48,65	0,0024379	0,0000017	1,434
$0,20 \cdot 10^{-5}M$	50,54	0,0015252	0,0000010	1,525
$0,06 \cdot 10^{-5}M$	53,35	0,0005298	0,0000003	1,766

siendo:

r: relación entre moles de fármaco unido a la seroalbumina bovina
y moles totales de proteína.

M: concentración del medicamento libre.

La representación gráfica de esta Tabla (Fig. 48) indica que al menos existen dos clases de puntos de unión. La curva obtenida puede descomponerse en la suma de dos rectas (1 y 2) representando las dos clases de puntos de unión. Las constantes de asociación (K_1, K_2) y el número de sitios de unión (N_1, N_2) para cada clase son:

$$\begin{aligned} K_1 &= 1,8 \cdot 10^5 & N_1 &= 0,010 \\ K_2 &= 2,7 \cdot 10^4 & N_2 &= 0,055 \end{aligned}$$

Las rectas de regresión lineal (y_1, y_2) y los coeficientes de correlación (r_1, r_2) correspondientes son:

$$y_1 = -176000x_1 + 1833 \quad r_1 = 0,975$$

$$y_2 = -26986x_2 + 1483 \quad r_2 = 0,9983$$

Fig. 47.- INTERACCION DE LA CLORTETRACICLINA (CTC) A CONCENTRACION DE $2,29 \cdot 10^{-4} M$ SOBRE LA UNION DEL L-PROPRANOLOL- 3H A LA SEROALBUMINA BOVINA.

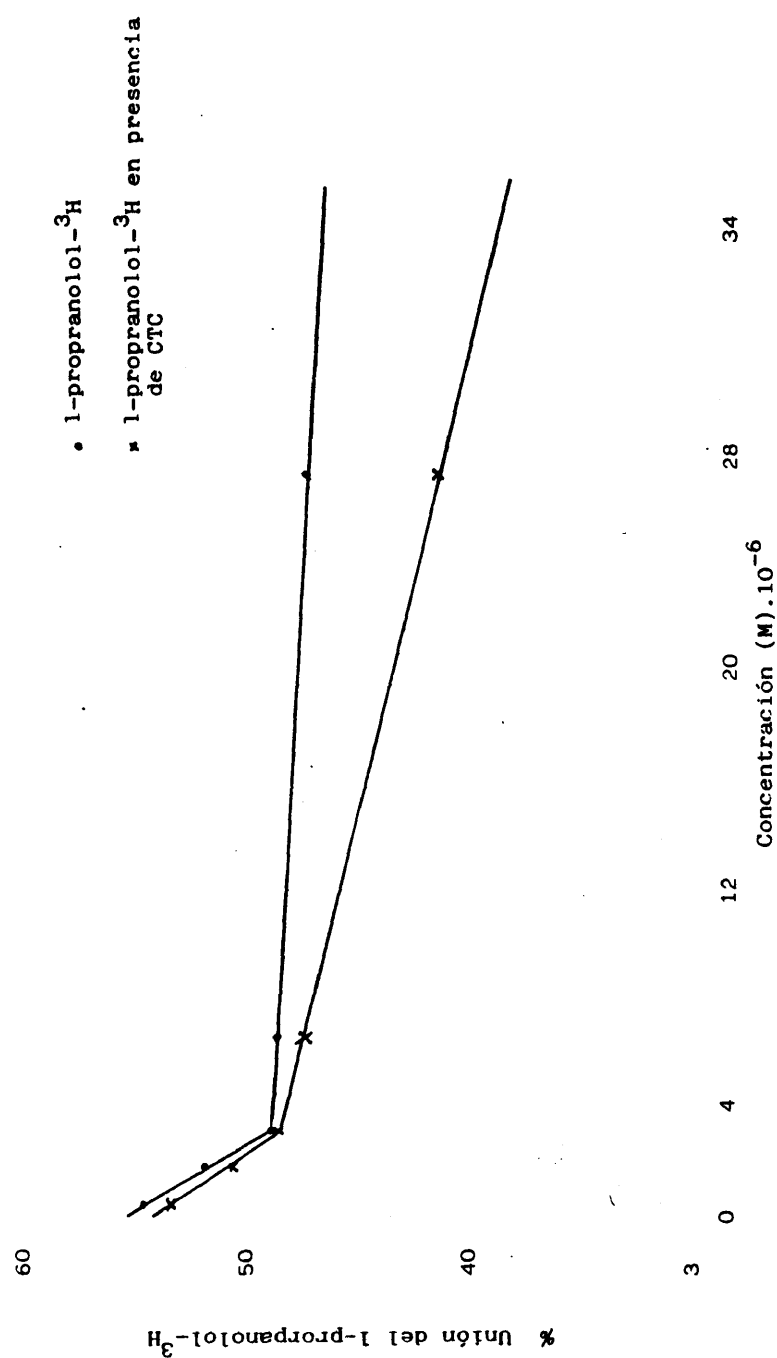


Fig. 48.- INTERACCION DE LA CLORTETRACICLINA (CTC) A CONCENTRACION DE $2,29 \cdot 10^{-4} M$ SOBRE LA UNION DEL L-PROPRANOLOL- 3H A LA SEROALBUMINA BOVINA.

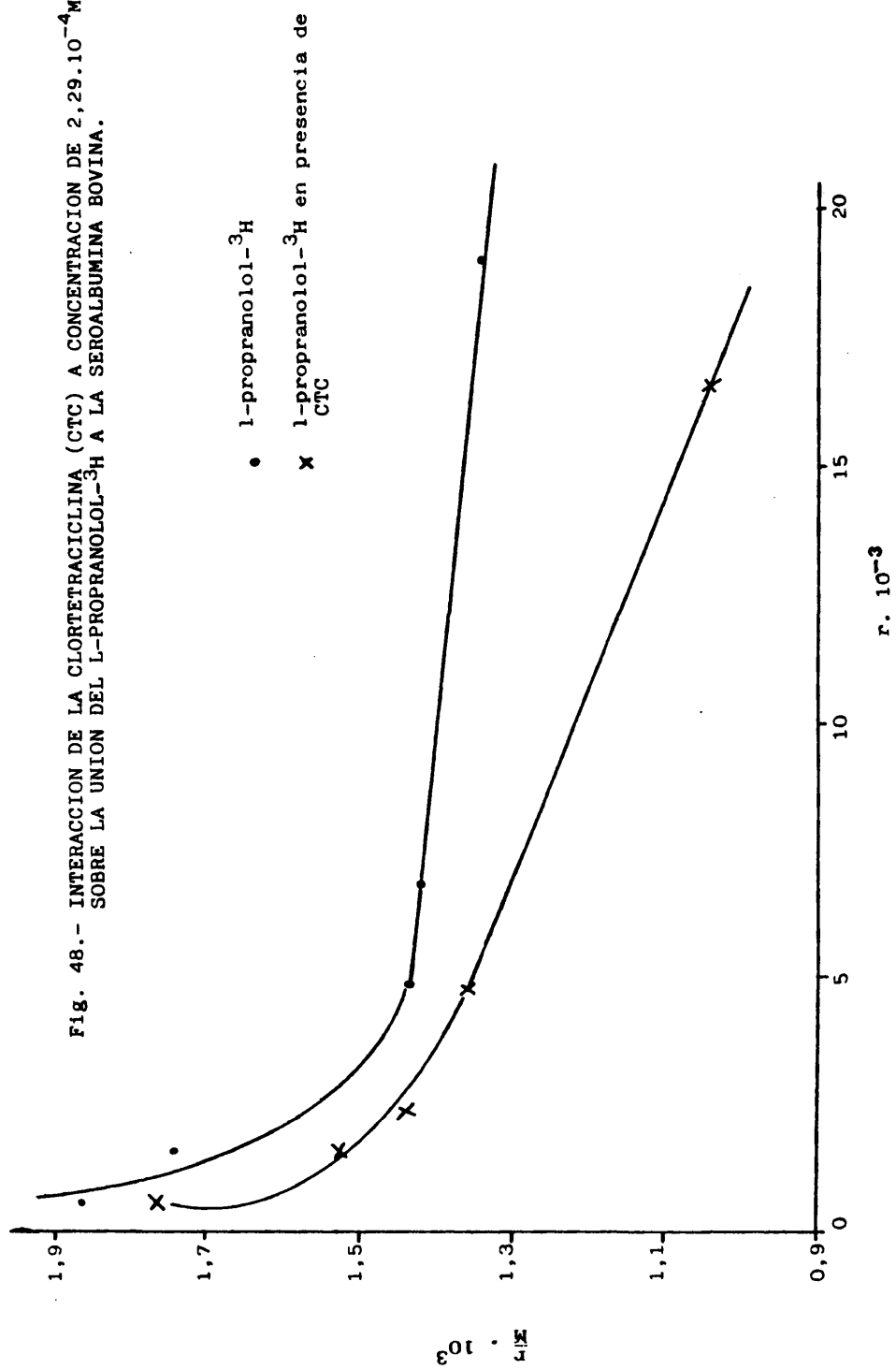


TABLA XLII.- INTERACCION DE LA DEMETILCLORTETRACICLINA (DMCTC)
A CONCENTRACION DE $2,36.10^{-4}M$ SOBRE LA UNION DEL
L-PROPRANOLOL- 3H A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración l-proprano- lol- 3H	% Unión l-propra- nolol- 3H . Valor medio.	% Unión l-pro- pranolol- 3H en presencia de DMCTC. Valor medio.	Desviación standard	Error standard de la media
	(\bar{U})	(\bar{U})	(DS)	(ESM)
$2,71.10^{-5}M$	47,46	40,28	0,97	0,49
$0,67.10^{-5}M$	48,70	44,25	0,90	0,43
$0,33.10^{-5}M$	49,00	44,95	0,76	0,27
$0,20.10^{-5}M$	51,98	47,00	0,80	0,31
$0,06.10^{-5}M$	54,60	49,71	0,84	0,40

Los resultados son valores medios de 4 experimentos.

Los resultados demuestran que la demetilclortetraciclina a concentración de $2,36.10^{-4}M$ origina un desplazamiento en el porcentaje de unión del l-propranolol- 3H a la seroalbúmina bovina.

El mayor desplazamiento observado fue para el caso del l-propranolol- 3H a concentración de $2,71.10^{-5}M$, siendo el valor del desplazamiento de 7,18.

Los porcentajes de unión del l-propranolol- 3H a la seroalbúmina bovina y los porcentajes de unión del l-propranolol- 3H en presencia de la demetilclortetraciclina a la seroalbúmina bovina vienen representados en la figura 49. Como se observa en la gráfica el mayor desplazamiento que origina la demetilclortetraciclina es para el l-propranolol- 3H a concentración de $2,71.10^{-5}M$ desplazándose de un 47,46% a un valor de 40,28%.

TABLA XLIII.- UNION DEL L-PROPRANOLOL-³H A LA SEROALBUMINA BOVINA EN PRESENCIA DE DEMETILCLORTETRACICLINA A LA CONCENTRACION DE $2,36 \cdot 10^{-4}$ M.

Concentración	% Unión	r	M	r/M . 10^3
$2,71 \cdot 10^{-5}$ M	40,28	0,0161004	0,0000162	0,994
$0,67 \cdot 10^{-5}$ M	44,25	0,0044313	0,0000037	1,198
$0,33 \cdot 10^{-5}$ M	44,95	0,0022156	0,0000018	1,231
$0,20 \cdot 10^{-5}$ M	47,00	0,0013293	0,0000010	1,329
$0,06 \cdot 10^{-5}$ M	49,71	0,0004431	0,0000003	1,477

siendo:

r: relación entre moles de fármaco unido a la seroalbumina bovina y moles totales de proteína.

M: concentración del medicamento libre.

La representación gráfica de esta Tabla (Fig. 50) indica que al menos existen dos clases de puntos de unión. La curva obtenida puede descomponerse en la suma de dos rectas (1,2) representando las dos clases de puntos de unión. Las constantes de asociación (K_1, K_2) y el número de sitios de unión (P_1, N_2) para cada clase son:

$$\begin{array}{ll} K_1 = 1,4 \cdot 10^5 & N_1 = 0,011 \\ K_2 = 1,7 \cdot 10^4 & N_2 = 0,074 \end{array}$$

Las rectas de regresión lineal (y_1, y_2) y los coeficientes de correlación (r_1, r_2) correspondientes son:

$$\begin{array}{ll} y_1 = -136667x_1 + 1523 & r_1 = 0,9932 \\ y_2 = -17277x_2 + 1270 & r_2 = 0,9985 \end{array}$$

Fig. 49.- INTERACCION DE LA DEMETILCLORTETRACICLINA (DMCTC) A CONCENTRACION DE $2,36 \cdot 10^{-4}M$ SOBRE LA UNION DEL L-PROPRANOLOL- 3H A LA SEROALBUMINA BOVINA

- l-propranolol- 3H
- * l-propranolol- 3H en presencia de DMCTC

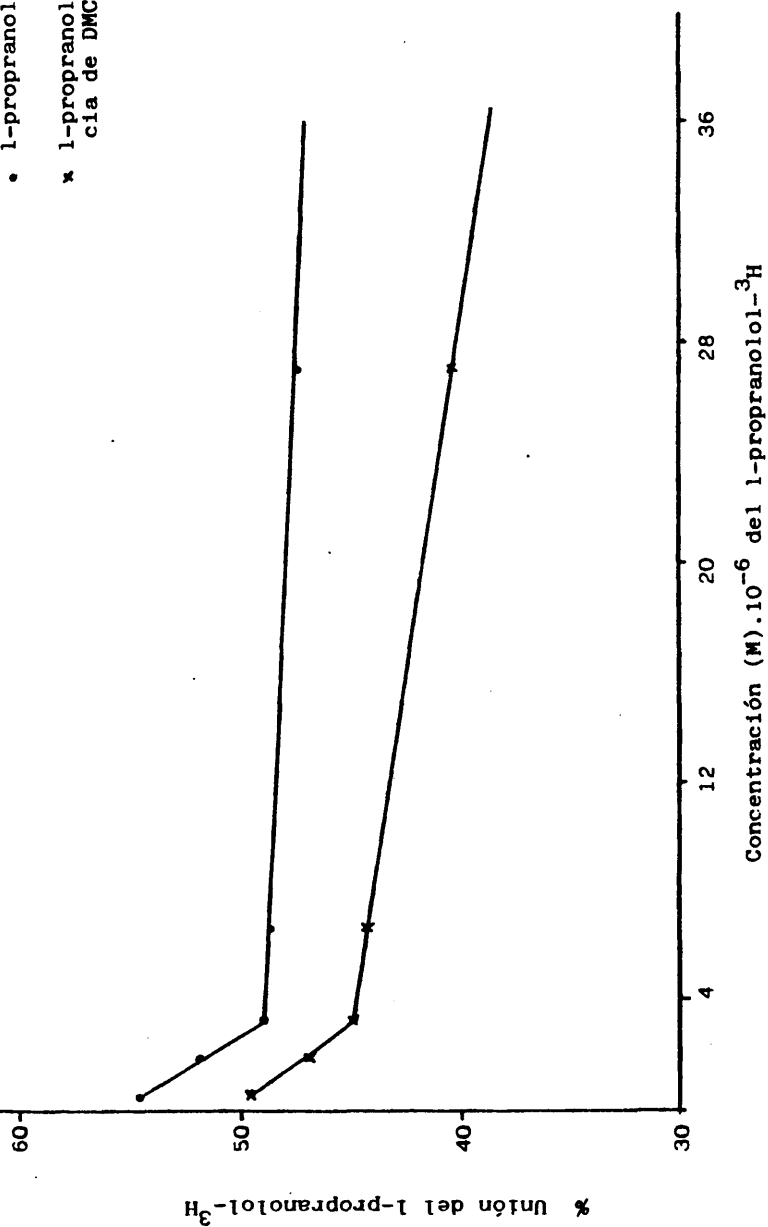


Fig. 50.- INTERACCION DE LA DEMETILCLORTETRACICLINA (DMCTC) A CONCENTRACION DE $2,36 \cdot 10^{-4}M$ SOBRE LA UNION DEL L-PROPRANOLOL- 3H A LA SEROALBUMINA BOVINA

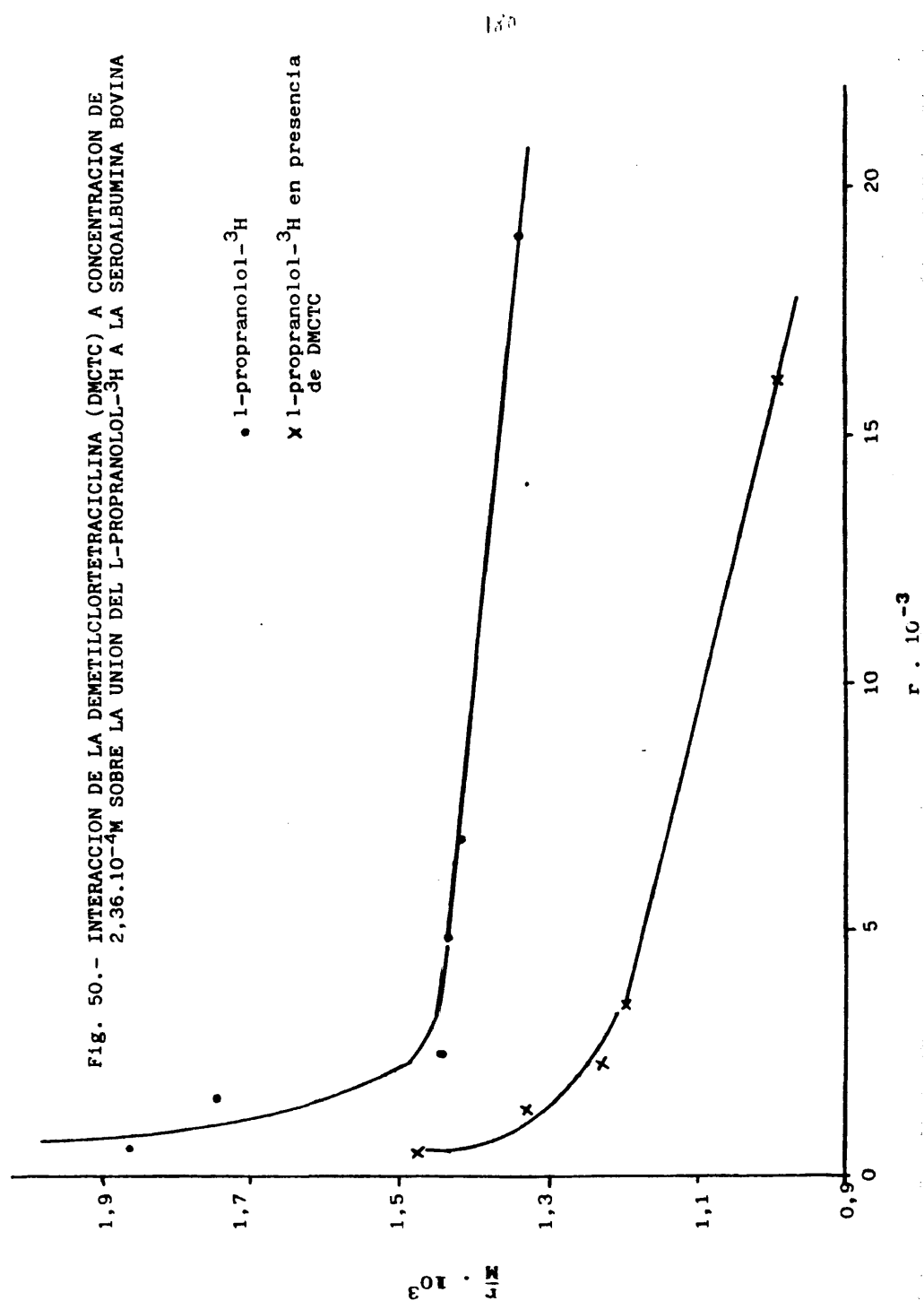


TABLA XLIV.- INTERACCION DE LA MINOCICLINA (MNC) A CONCENTRACION DE $2,40.10^{-4}M$ SOBRE LA UNION DEL L-PROPRANOLOL- 3H A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración l-proprano- lol- 3H	% Unión l-pro- pranolol- 3H . Valor medio (\bar{U})	% Unión l-pro- pranolol- 3H en presencia de MNC. Valor me- dio. (\bar{U})	Desviación standard (DS)	Error standard de la media (ESM)
$2,71.10^{-5}M$	47,46	39,06	1,18	0,42
$0,67.10^{-5}M$	48,70	45,10	1,97	0,70
$0,33.10^{-5}M$	49,00	46,16	1,07	0,54
$0,20.10^{-5}M$	51,98	46,38	1,50	0,60
$0,06.10^{-5}M$	54,60	49,94	1,30	0,75

Los resultados son valores medios de cuatro experimentos.

Los resultados demuestran que la minociclina a concentración de $2,40.10^{-4}M$ origina un desplazamiento en el porcentaje de unión del l-propranolol- 3H a la seroalbúmina bovina. El mayor desplazamiento observado fue para el caso del l-propranolol- 3H a concentración de $2,71.10^{-5}M$, siendo el valor del desplazamiento de 8,40.

Los porcentajes de unión del l-propranolol- 3H a la seroalbúmina bovina y los porcentajes de unión del l-propranolol- 3H en presencia de minociclina a la seroalbúmina bovina viene representado en la figura 51. Como se observa en la gráfica el mayor desplazamiento que origina la minociclina es para el l-propranolol- 3H a concentración de $2,71.10^{-5}M$ desplazandose de un 47,46% a un valor de 39,06%.

TABLA XLV.- UNION DEL L-PROPRANOLOL-³H A LA SEROALBUMINA BOVINA
EN PRESENCIA DE LA MINOCICLINAS A LA CONCENTRACION
DE $2,40 \cdot 10^{-4}M$

Concentración	% Unión	r	M	r/M . 10^3
$2,71 \cdot 10^{-5}M$	39,06	0,0156573	0,0000165	0,949
$0,67 \cdot 10^{-5}M$	45,10	0,0044313	0,0000037	1,198
$0,33 \cdot 10^{-5}M$	46,16	0,0022156	0,0000018	1,231
$0,20 \cdot 10^{-5}M$	46,38	0,0013293	0,0000010	1,329
$0,06 \cdot 10^{-5}M$	49,94	0,0004431	0,0000003	1,477

siendo:

r: relación entre moles de fármaco unido a la seroalbumina bovina
y moles totales de proteína.

M: concentración del medicamento libre.

La representación gráfica de esta Tabla (Fig. 52) indica que al menos existen dos clases de puntos de unión. La curva obtenida puede descomponerse en la suma de dos rectas (1,2) representando las dos clases de puntos de unión. Las constantes de asociación (K_1, K_2) y el número de sitios de unión (N_1, N_2) para cada clase son:

$$\begin{aligned} K_1 &= 1,4 \cdot 10^5 & N_1 &= 0,011 \\ K_2 &= 2,1 \cdot 10^4 & N_2 &= 0,060 \end{aligned}$$

Las rectas de regresión lineal (y_1, y_2) y los coeficientes de correlación (r_1, r_2) correspondientes son:

$$y_1 = -136666x_1 + 1523 \quad r_1 = 0,9932$$

$$y_2 = -21263x_2 + 1284 \quad r_2 = 0,9999$$

Fig. 51.- INTERACCION DE LA MINOCICLINA (MNC) A CONCENTRACION DE $2,40.10^{-4}$ M SOBRE LA UNION DEL L-PROPRANOLOL- 3 H A LA SEROALBUMINA BOVINA

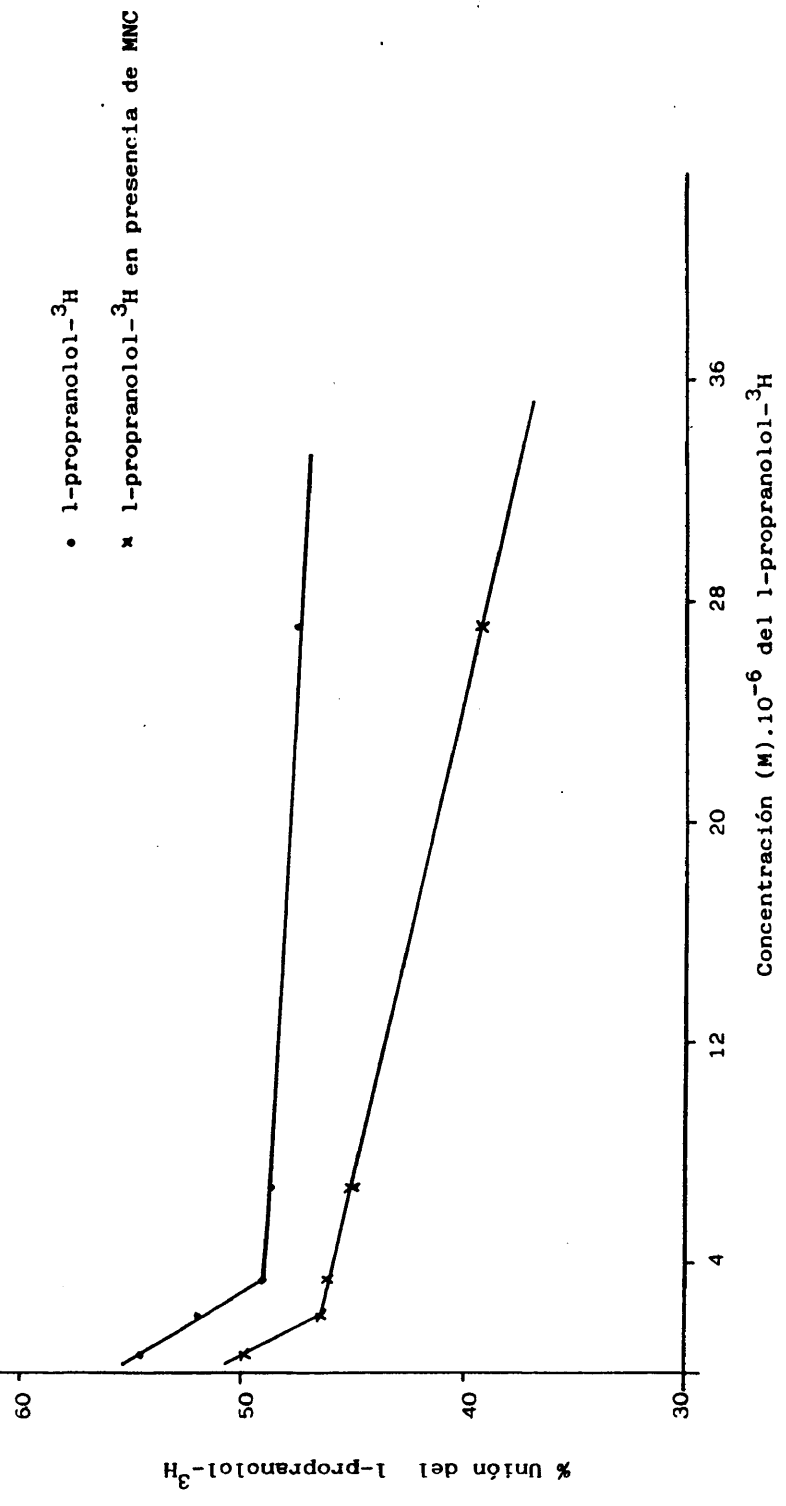


Fig. 52.- INTERACCION DE LA MINOCICLINA (MNC) A CONCENTRACION DE $2,40 \cdot 10^{-4} M$
 SOBRE LA UNION DEL L-PROPRANOLOL- 3H A LA SEROALBUMINA BOVINA.

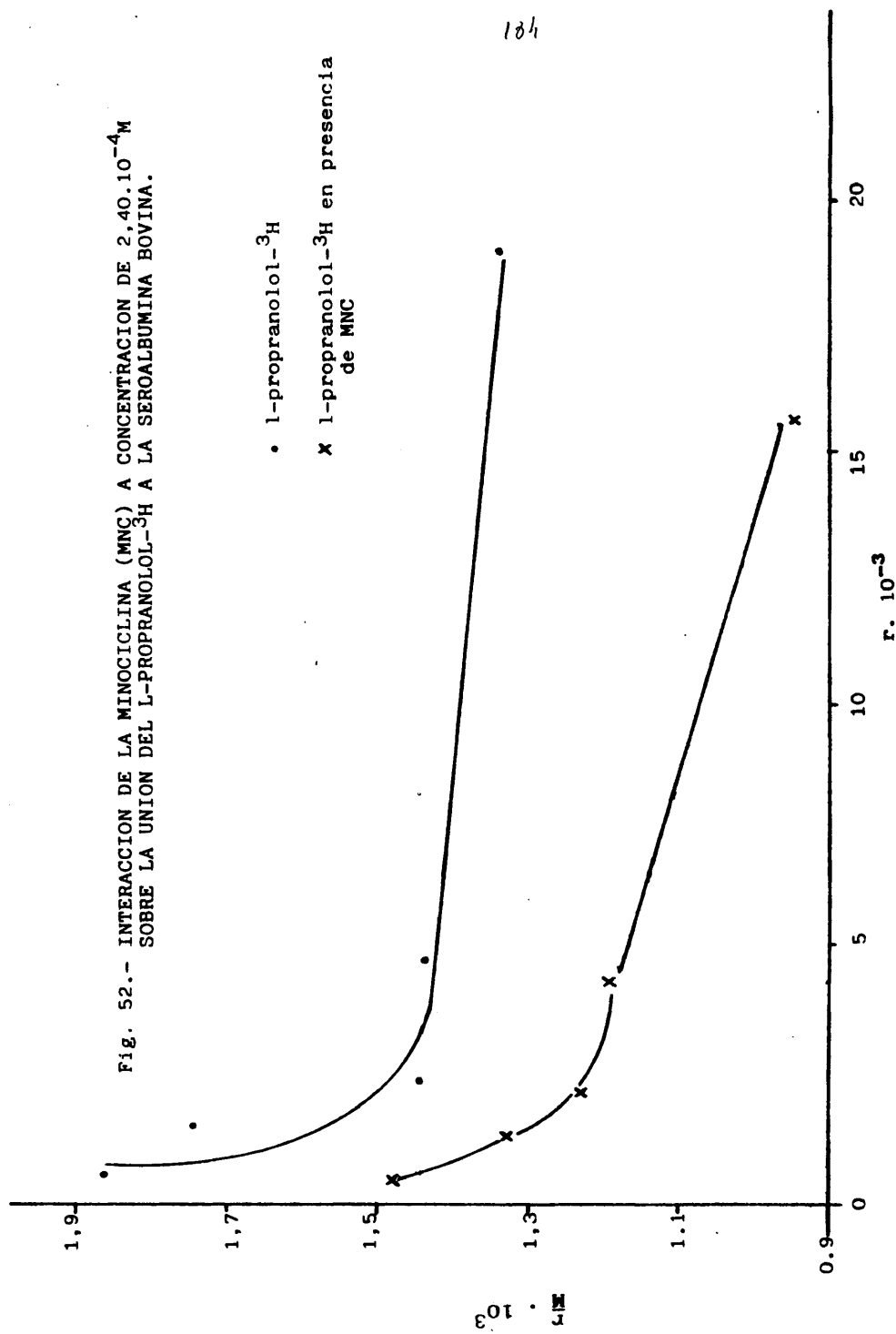


TABLA XLVI.- INTERACCION DE LA OXITETRACICLINA (OTC) A CONCENTRACION DE $2,39.10^{-4}M$ SOBRE LA UNION DEL L-PROPRANOLOL- 3H A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración l-proprano- lol- 3H	% Unión l-pro- pranolol- 3H . Valor medio	% Unión l-pro- pranolol- 3H en presencia de OTC. Valor me- dio.	Desviación standard	Error standard de la media
	(\bar{U})	(\bar{U})	(DS)	(ESM)
$2,71.10^{-5}M$	47,46	39,61	0,76	0,27
$0,67.10^{-5}M$	48,70	43,34	0,50	0,18
$0,33.10^{-5}M$	49,00	45,72	0,97	0,49
$0,20.10^{-5}M$	51,98	46,10	1,01	0,51
$0,06.10^{-5}M$	54,60	47,58	1,18	0,42

Los resultados son valores medios de cuatro experimentos.

Los resultados demuestran que la oxitetraciclina a concentración de $2,39.10^{-4}M$ origina un desplazamiento en el porcentaje de unión del l-propranolol- 3H a la seroalbúmina bovina. El mayor desplazamiento observado fue para el caso del l-propranolol- 3H a concentración de $2,71.10^{-5}M$, siendo el valor del desplazamiento de 7,85.

Los porcentajes de unión del l-propranolol- 3H a la seroalbúmina bovina y los porcentajes de unión del l-propranolol- 3H en presencia de oxitetraciclina a la seroalbúmina bovina viene representado en la figura 53. Como se observa en la gráfica el mayor desplazamiento que origina la oxitetraciclina es para el l-propranolol- 3H a concentración de $2,71.10^{-5}M$ desplazándose de un 47,46% a un valor de 39,61%.

TABLA XLVII.- INTERACCION DEL L-PROPRANOLOL-³H A LA SEROALBUMINA BOVINA EN PRESENCIA DE LA OXITETRACICLINA A CONCENTRACION DE $2,39 \cdot 10^{-4}$ M.

Concentración	% Unión	r	M	r/M . 10^3
$2,71 \cdot 10^{-5}$ M	39,61	0,0158050	0,0000163	0,970
$0,67 \cdot 10^{-5}$ M	43,34	0,0042836	0,0000038	1,127
$0,33 \cdot 10^{-5}$ M	45,72	0,0022156	0,0000018	1,231
$0,20 \cdot 10^{-5}$ M	46,10	0,0013293	0,0000011	1,209
$0,06 \cdot 10^{-5}$ M	47,58	0,0004431	0,0000003	1,477

siendo:

r: relación entre moles de fármaco uno a la seroalbúmina bovina y moles totales de proteína.

M: concentración del medicamento libre.

La representación gráfica de esta Tabla (Fig. 54) indica que al menos existen dos clases de puntos de unión. La curva obtenida puede descomponerse en la suma de dos rectas (1,2) representando las dos clases de puntos de unión. Las constantes de asociación (K_1, K_2) y el número de sitios de unión (N_1, N_2) para cada clase son:

$$\begin{aligned} K_1 &= 1,4 \cdot 10^5 & N_1 &= 0,011 \\ K_2 &= 1,4 \cdot 10^4 & N_2 &= 0,087 \end{aligned}$$

Las rectas de regresión lineal (y_1, y_2) y los coeficientes de correlación (r_1, r_2) correspondientes son:

$$y_1 = -136666x_1 + 1483 \quad r_1 = 0,8267$$

$$y_2 = -13651x_2 + 1184,97 \quad r_2 = 0,9999$$

Fig. 53.- INTERACCION DE LA OXITETRACICLINA (OTC) A CONCENTRACION DE $2,39 \cdot 10^{-4} M$
 SOBRE LA UNION DEL L-PROPRANOLOL- 3H A LA SEROALBUMINA BOVINA

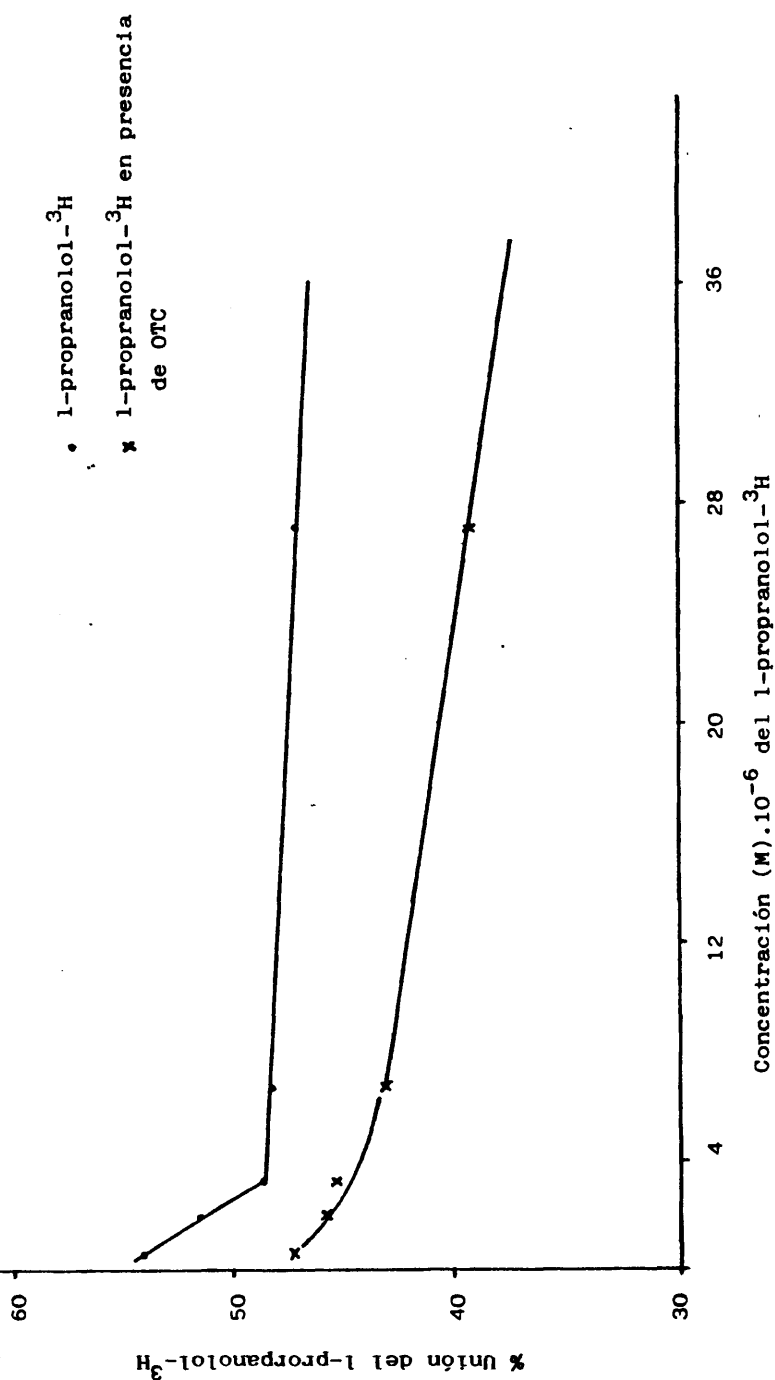


Fig. 54.- INTERACCION DE LA OXITETRACICLINA (OTC) A CONCENTRACION DE $2,39 \cdot 10^{-4} M$ SOBRE LA UNION DEL L-PROPRANOLOL- 3H A LA SEROALBUMINA BOVINA.

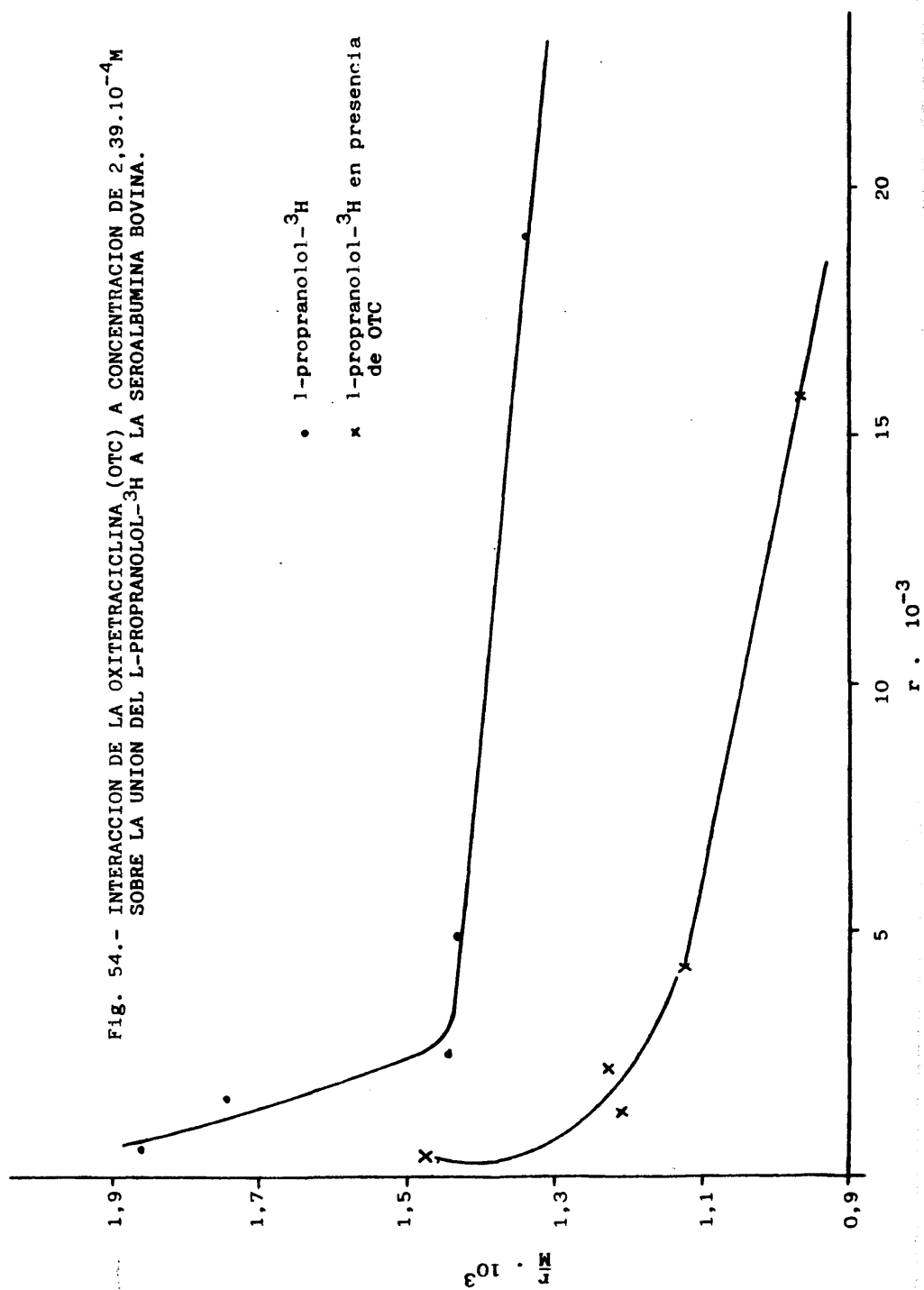


TABLA XLVIII.- INTERACCION DE LA TETRACICLINA (TCC) A CONCENTRACION DE $2,47 \cdot 10^{-4} M$ SOBRE LA UNION DEL L-PROPRANOLOL- 3H A LA SEROALBUMINA BOVINA.

Concentración l-propranolol- 3H	% Unión l-propranolol- 3H . Valor medio	% Unión l-propranolol- 3H en presencia de TCC. Valor medio.	Desviación standard	Error standard de la media
	(\bar{U})	(\bar{U})	(DS)	(ESM)
$2,71 \cdot 10^{-5} M$	47,46	38,58	1,18	0,43
$0,67 \cdot 10^{-5} M$	48,70	44,10	0,97	0,49
$0,33 \cdot 10^{-5} M$	49,00	45,50	0,76	0,27
$0,20 \cdot 10^{-5} M$	51,98	46,17	0,85	0,31
$0,06 \cdot 10^{-5} M$	54,60	47,00	0,90	0,42

Los resultados son valores medios de cuatro experimentos.

Los resultados demuestran que la tetraciclina a concentración de $2,47 \cdot 10^{-4} M$ origina un desplazamiento en el porcentaje de unión del l-propranolol- 3H a la seroalbúmina bovina. El mayor desplazamiento observado fue para el caso del l-propranolol- 3H a concentración de $2,71 \cdot 10^{-5} M$, siendo el valor del desplazamiento de 8,88.

Los porcentajes de unión del l-propranolol- 3H a la seroalbúmina bovina y los porcentajes de unión del l-propranolol- 3H en presencia de tetraciclina a la seroalbúmina bovina viene representado en la figura 55. Como se observa en la gráfica el mayor desplazamiento que origina la tetraciclina es para el l-propranolol- 3H a concentración de $2,71 \cdot 10^{-5} M$ desplazándose de un 47,46% a un valor de 38,58%.

TABLA IL.- UNION DEL L-PROPRANOLOL-³H A LA SEROALBUMINA BOVINA
EN PRESENCIA DE LA TETRACICLINA A LA CONCENTRACION
DE $2,47.10^{-4}M$

Concentración	% unión	r	M	r/M . 10^3
$2,71.10^{-5}M$	38,58	0,0153618	0,0000166	0,925
$0,67.10^{-5}M$	44,10	0,0042836	0,0000037	1,158
$0,33.10^{-5}M$	45,50	0,0022156	0,0000018	1,231
$0,20.10^{-5}M$	46,17	0,0013293	0,0000010	1,329
$0,06.10^{-5}M$	47,00	0,0004431	0,0000003	1,477

siendo:

r: relación entre moles de fármaco unido a seroalbúmina bovina y
moles totales de proteína.

M: concentración del medicamento libre.

La representación gráfica de esta Tabla (Fig. 56) indica que al menos existen dos clases de puntos de unión. La curva obtenida puede descomponerse en la suma de dos rectas (1,2) representando las dos clases de puntos de unión. Las constantes de asociación (K_1, K_2) y el número de sitios de unión (N_1, N_2) para cada clase son:

$$K_1 = 1,4.10^5 \quad N_1 = 0,011$$

$$K_2 = 2,1.10^4 \quad N_2 = 0,06$$

Las rectas de regresión lineal (y_1, y_2) y los coeficientes de correlación (r_1, r_2) correspondientes son:

$$y_1 = -136666x_1 + 1523 \quad r_1 = 0,9932$$

$$y_2 = -20996x_2 + 1247 \quad r_2 = 0,9999$$

FIG. 55.- INTERACCION DE LA TETRACICLINA (TCC) A CONCENTRACION DE $2,47 \cdot 10^{-4} M$ SOBRE LA UNION DEL L-PROPRANOLOL- 3H A LA SEROALBUMINA BOVINA.

• l-propranolol- 3H
 x l-propranolol- 3H en presencia de TCC

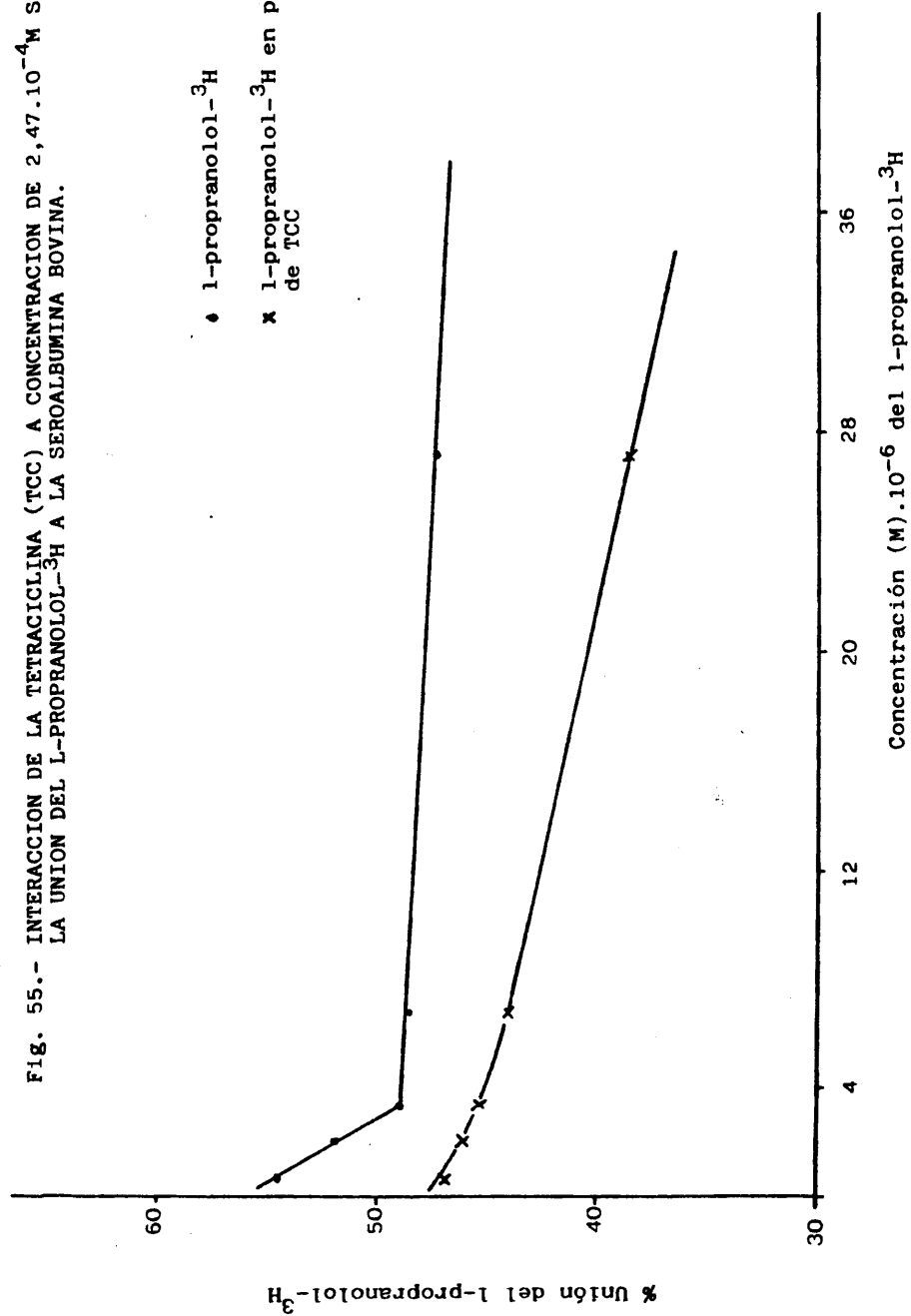


Fig. 56.- INTERACCION DE LA TETRACICLINA (TCC) A CONCENTRACION DE $2,47 \cdot 10^{-4} M$
 SOBRE LA UNION DEL L-PROPRANOLOL- 3H A LA SEROALBUMINA BOVINA.

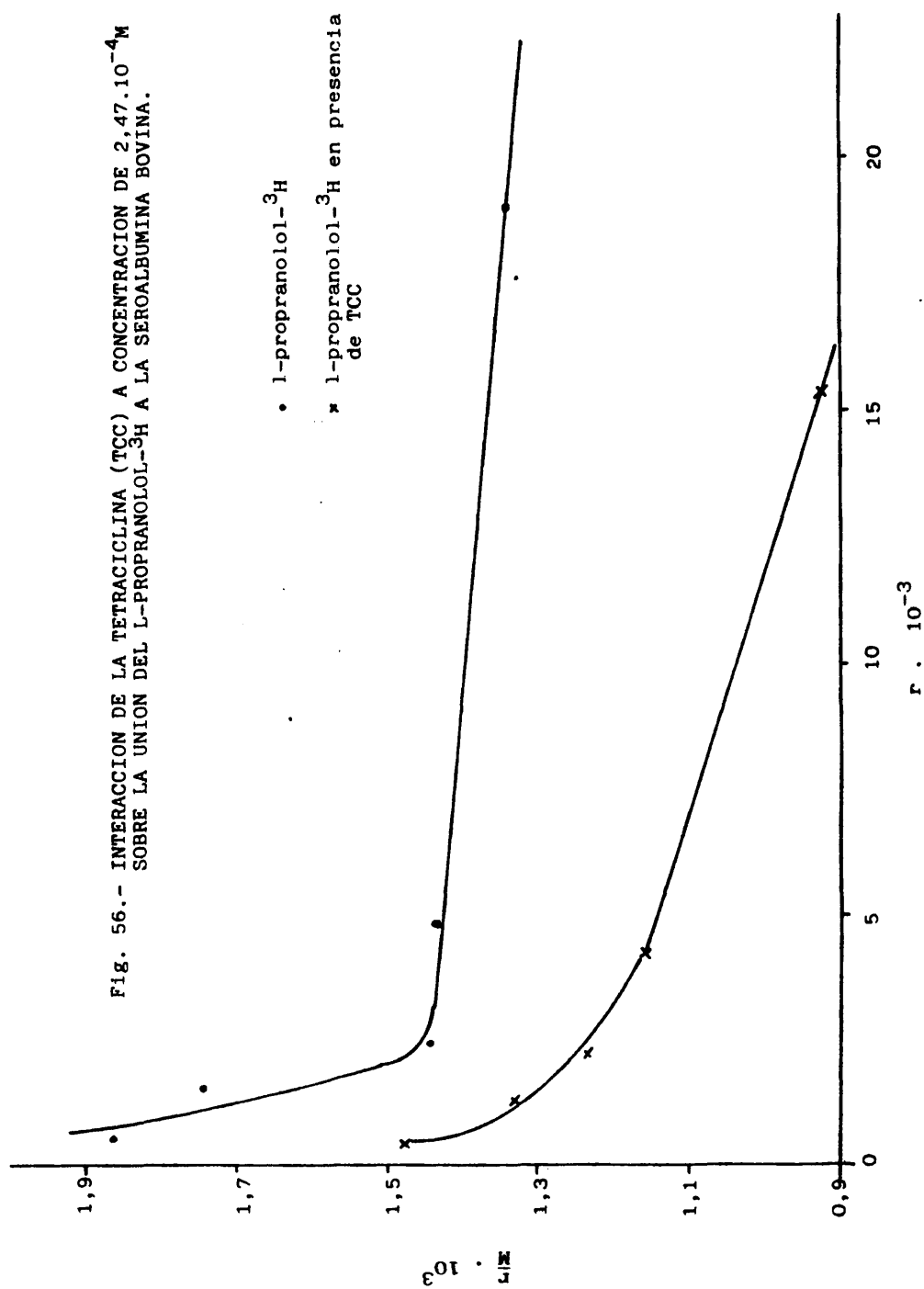


TABLA L.- PARAMETROS DE UNION PARA L-PROPRANOLOL-³H EN PRESENCIA DE UNA SERIE DE TETRACICLINAS.

	K ₁	N ₁	K ₂	N ₂
l-propranolol	2,2.10 ⁵	0,0092	5,6.10 ³	0,26
l-propranolol + CTC (2,29.10 ⁻⁴ M)	1,8.10 ⁵	0,010	2,7.10 ⁴	0,055
l-propranolol + DMCTC (2,36.10 ⁻⁴ M)	1,4.10 ⁵	0,0225	1,7.10 ⁴	0,074
l-propranolol + MNC (2,40.10 ⁻⁴ M)	1,4.10 ⁵	0,011	2,1.10 ⁴	0,06
l-propranolol + OTC (2,39.10 ⁻⁴ M)	1,4.10 ⁵	0,011	1,4.10 ⁴	0,087
l-propranolol + TTC (2,47.10 ⁻⁴ M)	1,4.10 ⁵	0,011	2,1.10 ⁴	0,06

K₁ y K₂ : constantes de asociación

N₁ y N₂ : número de sitios de unión.

Finalmente la TABLA L representa en síntesis la interacción de la serie de tetraciclinas estudiadas frente a la unión del l-propranolol-³H a la seroalbúmina bovina. Como se observa la serie de tetraciclinas estudiadas afectan las constantes de asociación y el número de sitios de unión para el l-propranolol-³H a la seroalbúmina bovina.

116

DISCUSSION

4. Discusión.

La interacción de fármacos con proteínas plasmáticas está siendo objeto de numerosas investigaciones, siendo uno de los más importantes factores el fenómeno de competición entre fármacos por los sitios de unión a proteínas. Los fármacos tanto de estructura similar como de estructura marcadamente diferente pueden competir por la misma posición de unión.

En la clínica moderna se reconoce que una terapia conjunta de fármacos puede producir alteraciones en las concentraciones plasmáticas, y en el índice de excreción de estos fármacos, no solo por fenómenos de inducción de enzimas metabólicas, sino también por una competición en los sitios de unión. Así se ha demostrado (151) que los niveles plasmáticos del sulfaetiltiazol en ratas son reducidos alrededor de 2 a 3 veces, tras una administración conjunta con sulfinpirazona, un compuesto ampliamente unido, con la única similitud estructural de una carga negativa. Otro sería el caso de las sulfamidas cuya eliminación también es afectada en el perro tras una administración conjunta con sulfinpirazona.

Un efecto de competición, importante clínicamente, es el referente a la terapia anticoagulante y analgésica. Se ha encontrado un antagonismo de la unión de la warfarina y fenilbutazona "in vitro" por sustancias tan variadas como la tolbutamida, indometacina, sulfametoxipiridazina, etc... (4). Diversos de estos compuestos competitivos han sido ensayados "in vivo" en ra-

tón y en hombre y se ha observado un aumento de la respuesta anticoagulante de la hidroxycumarina (152). Asimismo, se ha reportado que la fenilbutazona y la warfarina compiten por los mismos sitios de unión en la albúmina plasmática ya que la constante de asociación aparente warfarina -- albúmina se reduce en presencia de fenilbutazona. La potencia de la respuesta anticoagulante fue debida a un incremento de la concentración de warfarina libre desplazada por la fenilbutazona.

Otro factor importante a estudio es el hecho de que un incremento en la concentración del fármaco libre puede también originar un más amplio metabolismo y surgir interacciones farmacológicas.

Por otra parte existen casos no usuales en la unión proteica, como es lo observado para el caso de la clorotiazida (153). La clorotiazida puede incrementar hasta cuatro veces la unión a proteínas del agente bloqueante ganglionar, pempidina. Ya que estos dos fármacos son comunmente dados juntos en terapeutica, este hallazgo es muy significativo y debe prestársele atención. Parece propio que la clorotiazida aniónica podría actuar como un intermediario entre la albúmina y la pempidina catiónica.

La unión de la quinidina a proteínas séricas y en concreto a la seroalbúmina ha sido estudiada por diversos investigadores (86,85). Estos trabajos establecen que la quinidina se une a las proteínas séricas en suero normal en un grado casi igual que la unión a la seroalbúmina. La unión de la quinidina, a concentración de 10^{-8} M, a fracciones protéicas séricas evaluada por filtración de gel y ultracentrifugación, alcanza valores

del 50-60%. En nuestros resultados el mayor porcentaje de unión de la quinidina a la seroalbúmina bovina fue de un 80% a concentración de $5,50 \cdot 10^{-6} \text{M}$ por lo que se podría pensar que la seroalbúmina posee lugares más específicos de unión para la quinidina con respecto a las lipoproteínas séricas. No obstante, algunas observaciones indican (132, 154) que los fármacos que se disuelven en la parte lipídica, como le ocurre a la quinidina por ser una molécula altamente liposoluble a $\text{pH} = 7,30$, podría estar sujeta a un fenómeno de disolución.

Por otra parte, se podría considerar que, las lipoproteínas, como cualquier otra proteína, pueden estar afectadas por los distintos procedimientos de separación utilizando cuando estas se aíslan a partir de otras macromoléculas y por la influencia de diferentes fases acuosas de las del suero. Con estas observaciones, las propiedades de unión observadas para la quinidina entre proteínas séricas y la seroalbúmina deben ser analizadas con precaución aunque lógicamente, los parámetros de unión deben marcar el grado de unión de la quinidina a proteínas aisladas.

La quinidina se une cuantitativamente a la albúmina en una relación establecida a $\text{pH} = 7,4$. Existe un aceptor o sitio de fijación localizado en la albúmina para la quinidina con una $K_a = 7,7 \cdot 10^3$ (85). Sin embargo, también se sugiere la posibilidad de que existen, al menos, dos sitios de unión en la molécula de albúmina implicados para la quinidina. Se ha demostrado que iones como el Na, K, H, Ca y Cl a diversas concentraciones y a $\text{pH} = 7,4$, y a otros valores de pH , alteran marcadamente la unión de la qui-

nidina con la albúmina. Ultimamente se viene estableciendo dos sitios en la molécula de albúmina implicados en la reacción de unión para la quinidina que son por una parte un grupo imidazol de un residuo de histidina y por otra un grupo OH en un residuo de serina ó tirosina (86). Los valores de la constante de asociación y el número de sitios de unión que describen la relación estequiométrica entre la quinidina y la albúmina descritos en la bibliografía, se ajustan a unas constantes de asociación a valores que incrementan desde $2,0 \cdot 10^3$ hasta $1,2 \cdot 10^4$ en función de los valores de pH que van desde 5,5 a 10,0 (86). Estos valores de K_a se ajustan en cierto grado a los encontrados en nuestra experimentación, en el que se observa que al menos existen dos clases de puntos de unión implicados en la reacción de unión. Es aparente que el grado de unión de la quinidina a la molécula de la albúmina está influenciado por el pH. Variaciones demostrables en la fracción de quinidina unida a la albúmina pueden anticiparse como una consecuencia de acidosis ó alkalosis producida en presencia de enfermedades ó procesos patológicos desencadenantes de valores extremadamente altos de calcio ionizado en suero y también durante la administración de dosis relativamente altas de calcio. Se puede pensar en la posibilidad de que al igual que ciertas alteraciones iónicas producen variaciones en el grado de unión de la quinidina con la albúmina, también pueden afectar y originar cambios en la unión de la quinidina a otras proteínas celulares; y por lo tanto una alteración en el Ca^{2+} y el H^+ intracelular pueden tener una importante influencia sobre la unión de la quinidina a nivel celular lo que implicaría

alteraciones en la acción farmacológica de la quinidina o bien sobre su toxicidad.

La quinidina, fármaco que posee un gran volumen de distribución, logicamente también posee un alto grado de unión a las proteínas plasmáticas. En suero de rata se ha demostrado que la quinidina posee al menos dos clases de sitios de unión con unas constantes de asociación de $5,06 \cdot 10^4$ y $4,52 \cdot 10^2$ (93), parámetros observados con equilibrio de diálisis. En nuestro trabajo se observan unas constantes de asociación de $4,9 \cdot 10^4$ y $5,7 \cdot 10^3$ de la quinidina a la seroalbúmina bovina.

La albúmina ha sido referida como la principal proteína de unión de la quinidina en suero humano (85, 155), aunque un 30% de la quinidina unida en suero está confinada a lipoproteínas en comparación con un 65-70% unida a la albúmina sérica. La mayoría de los pacientes tratados con quinidina probablemente tienen niveles séricos de albúmina dentro de un rango normal mientras que en las concentraciones séricas de triglicéridos y colesterol que reflejan los niveles de lipoproteínas se pueden esperar niveles que varíen en un mayor rango. Por ello en nuestra investigación se eligió la seroalbúmina para evaluar la unión de la quinidina y sus posibles interacciones con otros fármacos como extrapolación de estudios de desplazamiento de efectos en una posible terapia conjunta. Las concentraciones de lipoproteínas en suero en individuos sanos se conocen que varían mucho y sin embargo, las concentraciones de albúmina se pueden fijar en un rango normal. Por el contrario, existen considerables variaciones en las concentraciones séricas de triglicéridos y coleste-

rol, tanto en individuos sanos como en pacientes potenciales con insuficiencia cardíaca. Logicamente estos triglicéridos y colesterol van a reflejar la variación en la concentración de lipoproteínas.

La variación de resultados que se observa en la biliografía sobre la unión de la quinidina a proteínas séricas que señalan valores de la fracción libre de quinidina en un rango de 15,7 a 39,2% se podría explicar por este fenómeno de variación en el contenido de triglicéridos y colesterol. Cuando ambos lípidos séricos están sometidos a gran variación, la unión de quinidina a proteínas séricas conferirá variaciones farmacodinámicas y farmacocinéticas en aquellos pacientes tratados por quinidina.

En presencia de la serie de tetraciclinas estudiadas en nuestro trabajo, se ha observado una disminución del porcentaje de unión de la quinidina a la seroalbúmina. Este desplazamiento en la reacción de unión por las tetraciclinas, podría sugerir que las tetraciclinas disminuyen el volumen aparente de distribución de la quinidina, posiblemente por este desplazamiento de la quinidina de sus lugares de unión. Los estudios de unión llevados a cabo reflejan este posible mecanismo. Bajo este mecanismo las concentraciones séricas de quinidina incrementan en aquellos pacientes tomando una terapia conjunta de tetraciclinas y beta-bloqueantes tipo quinidina o propranolol ya que este efecto ha sido encontrado inequívocamente en todos los estudios realizados en el presente trabajo. Este fenómeno observado es concordante con la interacción establecida entre la di-

goxina y la quinidina (156) que aunque su mecanismo no está todavía demasiado claro, si la eliminación renal de la digoxina está disminuida en presencia de quinidina (157,158,159).

Por el contrario en el estudio realizado de interacción de la quinidina sobre una serie de tetraciclinas no se observó un desplazamiento tan significativo de los lugares de unión de las tetraciclinas a la seroalbúmina bovina. Unicamente se puede destacar que la quinidina si desplaza en cierto grado a la demetilclortetraciclina de sus lugares de acción.

Con respecto al propranolol el efecto observado ha sido inverso. Las tetraciclinas afectan la unión de l-propranolol a la seroalbúmina bovina en cierto grado, pero el efecto más significativo es el desplazamiento originado por el l-propranolol en la unión de las tetraciclinas a la seroalbúmina bovina.

El propranolol se une a proteínas plasmáticas y generalmente el grado de unión varia poco entre sujetos normales (160), por lo que se puede sugerir que pequeñas alteraciones en la unión del propranolol a proteínas plasmáticas pueden originar alteraciones significativas en la concentración del fármaco libre con sus consecuencias clínicas. Sin embargo se ha demostrado por equilibrio de diálisis que el propranolol se une a proteínas plasmáticas en un 91-95% en diferentes especies animales (101) señalándose que la unión de propranolol recae principalmente sobre la albúmina sérica, aunque también puede unirse a otras proteínas tipo lipoproteínas séricas. En nuestros resultados encontramos valores de unión a la seroalbúmina bovina en un 55%, que están relacionados con los señalados en

bibliografía para la albúmina humana (101).

Dada la importancia clínica que tienen los beta-bloqueantes adrenérgicos, el propranolol en terapéutica puede alterar un tratamiento óptimo por cambios en la unión a proteínas como consecuencia de una interacción farmacológica o de afecciones patológicas.

Poco se ha señalado en la bibliografía sobre la interacción de las tetraciclinas sobre estos beta-bloqueantes adrenérgicos que pueden ser suministrados a pacientes en terapia conjunta. De toda la serie de tetraciclinas estudiadas, todos estos fármacos desplazan el porcentaje de unión del 1-propranolol a la seroalbúmina bovina en valores pequeños pero muy próximos. Las constantes de asociación del 1-propranolol y los puntos de unión se ven alterados por la presencia de las tetraciclinas. Se podría señalar como hecho más significativo que la constante K_2 y el número de sitios de ligazón N_2 son los parámetros de unión mas afectados, disminuyéndose el número de sitios de unión N_2 . El 1-propranolol exhibe al menos dos clases de puntos de unión, uno relativamente de alta afinidad pero de pequeño número de sitios (K_1, N_1), y otro segundo de baja afinidad pero de mayor número de sitios de unión. Las tetraciclinas afectan de forma más significativa a este segundo tipo de baja afinidad y mayor número de sitios de unión. Esto podría sugerir que las concentraciones del fármaco libre y copulado van a ser alteradas por lo que se necesitaría una vigilancia clínica de los niveles sanguíneos.

Ahora bien, como ya hemos mencionado anteriormente

el hecho más espectacular en este trabajo, es el desplazamiento que el propranolol origina sobre el porcentaje de unión de todas las tetraciclinas estudiadas, desplazamiento que alcanza valores desde un 90,46% en condiciones normales, hasta una reducción a un valor de 27,50% de unión para la minociclina en presencia de propranolol.

Los antibióticos en general vienen recibiendo una atención considerable por su implicación de su unión potética con los fenómenos farmacológicos específicos de estos quimioterápicos.

Se han estudiado (161,162,163) fenómenos de unión de las penicilinas por diálisis o por ultrafiltración. Existe correlación entre el grado con el que la actividad se disminuye en suero y con el grado de unión a proteínas. En general, siempre se ha concluido que únicamente la fracción libres es capaz de ejercer la actividad antimicrobiana. Este fenómeno está corroborado por el hallazgo de que la actividad de las penicilinas en suero se ve aumentada por fármacos que las desplazan de su unión a proteínas. Sin embargo, aún no existe una relación clara de éste fenómeno y el tejido inflamado. Se conoce que durante la inflamación los niveles totales de antibióticos en los tejidos aumentan debido a un exflujo de proteínas plasmáticas a partir de los capilares al espacio histico. Por lo tanto, se señala que el contenido de proteínas del exudado peritoneal es similar al del suero, y que consecuentemente, las penicilinas altamente enlazadas están igualmente distribuidas entre los dos fluidos (164).

Ya que se ha establecido que la fracción de antibiótico unido a proteínas es inactiva, la concentración eficaz de antibiótico podría venir aun representada por el nivel libre en fluido histico, el cual vuelve a estar en equilibrio con el nivel libre en plasma. Sin embargo, por otra parte, se ha encontrado también (164), que el antibiótico ampicilina, pobremente unido, alcanza una concentración en fluido inflamatorio 2,5 veces mayor que la del plasma y también se ha encontrado (165) que los niveles totales de bencilpenicilina en exudado inflamatorio exceden de los niveles plasmáticos totales y persisten tras que el antibiótico ha desaparecido del torrente circulatorio.

Se han realizado ensayos para estudiar el efecto de la unión a proteínas sobre la eficacia de antibióticos frente a infecciones "in vivo". Como es esperado, se establece que la actividad "in vivo" debe depender no solo de los niveles sanguíneos, sino también del periodo de tiempo en los que estos niveles se mantienen. Un buen índice de eficacia "in vivo" es el referido a concentración plasmática total máxima/concentración mínima inhibitoria en suero.

La influencia de la unión a proteínas sobre la actividad farmacológica de los antibióticos es un punto claro de estudio y la unión a proteínas séricas es un factor que ejerce un efecto clave sobre la actividad farmacológica, sobre los índices de excreción renal, distribución orgánica y apareamiento de los agentes antimicrobianos en los espacios intersticiales y fluidos inflamatorios.

Ya se ha mencionado, como, mecanismos tales como que-

lación, adsorción y unión iónica e hidrofóbica han sido propuestos para la unión de las tetraciclinas a la albúmina sérica (126,128). Mucho se ha estudiado sobre la interacción de las tetraciclinas a diversas proteínas pero no existe en la bibliografía la posible interacción de las tetraciclinas frente a fármacos antiarrítmicos clásicos como quinidina y propranolol, o bien al contrario.

Las tetraciclinas son compuestos altamente unidos a proteínas plasmáticas y en concreto a la seroalbúmina bovina, nosotros hemos encontrado resultados en la serie estudiada entre un rango de 85-93% de unión.

Las estructuras químicas de los análogos de tetraciclinas estudiadas, difieren unas de otras en la presencia o ausencia, bien de un átomo de cloro ó un grupo hidroxí ó metilo. Estas diferencias químicas no suelen ir acompañadas por variaciones en el espectro antimicrobiano, aunque si se han observado ciertas diferencias en la actividad relativa frente a ciertos organismos (166,167); ellas sin embargo, se asocian con mayores diferencias en las propiedades físicas de los análogos. Bajo condiciones fisiológicas de temperatura y pH, la clortetraciclina es más rápidamente inactivada mientras que otros análogos son más estables (168). Únicamente la demetilclortetraciclina permanece estable a 100°C, y a pH altamente ácido ó alcalino. Otros factores tales como diferencias en la solubilidad y afinidad a ciertos tejidos incluyendo plasma sanguíneo, pueden influir y adicionarse en la diferente distribución, secuestro en ciertos órganos, y velocidad de eliminación de estos análogos de tetraciclinas.

En el presente estudio encontramos que las tetraciclinas están altamente unidas a la seroalbúmina bovina siendo el mayor porcentaje para la oxitetraciclina con un 96% y para la clortetraciclina con un 94%. Todos los análogos de tetraciclinas estudiados exhiben al menos dos sitios de unión, uno de relativamente alta afinidad pero de menor número y otro de baja afinidad pero de mayor número. Dado los valores de los parámetros de unión encontrados para las tetraciclinas, se sugiere que la unión al plasma de estos antibióticos tienen un efecto marcado sobre las propiedades del fármaco ya que las constantes de asociación son mayores que 10^4 , en concordancia con el máximo porcentaje de unión que excede a un 85%.

Este alto porcentaje de unión de las tetraciclinas estudiadas se ve fuertemente afectado en presencia de propranolol. El propranolol desplaza a las tetraciclinas en alto grado lo que logicamente aumentará los niveles séricos de las tetraciclinas libres, estos potencialmente puede ser peligroso y se puede originar una terapia inadecuada ya que la distribución principalmente es dependiente de la cantidad de fármaco libre.

Se viene considerando al receptor integrado por múltiples moléculas de proteínas funcionales, al menos constituido por dos componentes: a) Los aceptores de unión de afinidad para el ligando y b) el componente formado por las macromoléculas que constituyen los transductores, los efectores y los mensajeros, tc.. (169,170).

Las dificultades en la extrapolación e interpretación de los resultados farmacocinéticos y farmacodinámicos a la efi-

cacia terapéutica es el problema de mayor envergadura científica y a veces de no fácil solución que se presenta tras la prescripción de un tratamiento terapéutico.

KOCH-WESER en 1980 afirmó: "que la evaluación por la respuesta del paciente (efector farmacodinámico y acciones terapéuticas) es lo más simple, lo más eficaz, y el camino más completo realizable para determinar los requerimientos de la dosificación individual de un medicamento" (135).

Pero así como los efectos farmacodinámicos pueden ser cuantificados, no así las respuestas terapéuticas, las cuales pueden ser consecuencia de efectos a largo plazo, siendo entonces muy difíciles de evaluar.

Es claro en el desarrollo de nuestro trabajo que el fenómeno de interacción farmacológica sobre la unión a proteínas puede originar efectos importantes en la farmacocinética de los compuestos estudiados. Se podría establecer como consideración final que el clínico al prescribir un tratamiento farmacoterapéutico, no debe olvidar nunca que está muy obligado a seguir la secuencia de la modificación que la medicación produce en cada uno de los síntomas ó los síndromes del proceso morboso que esta tratando (169). Para ello se deberá considerar aisladamente y de un modo general los niveles plasmáticos al igual que los demás parámetros farmacocinéticos. Esta información cobrará una gran importancia cuando se relacione con los efectos farmacodinámicos y con los resultados terapéuticos dentro del escenario clínico.

CONCLUSIONES

Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos se podrian sugerir las siguientes conclusiones:

1) La quinidia se une a la seroalbúmina bovina alcanzando el mayor porcentaje de unión de 79,00% a la concentración de $5,50 \cdot 10^{-6} M$.

2) Los resultados de unión de la quinidina a la seroalbúmina bovina indican que al menos existen dos clases de sitios de unión, siendo los parámetros de unión encontrados:

$$\begin{array}{ll} K_1 = 4,9 \cdot 10^4 \text{ l.mol}^{-1} & N_1 = 0,050 \\ K_2 = 5,7 \cdot 10^3 \text{ l.mol}^{-1} & N_2 = 0,5 \end{array}$$

3) La clortetraciclina se une a la seroalbúmina bovina alcanzando el mayor porcentaje de unión de 94,25% a la concentración de $1,67 \cdot 10^{-4} M$.

4) Los resultados de unión de la clortetraciclina a la seroalbúmina indican que al menos existen dos clases de sitios de unión, siendo los parámetros de unión encontrados:

$$\begin{array}{ll} K_1 = 9,80 \cdot 10^3 \text{ l.mol}^{-1} & N_1 = 2,26 \\ K_2 = 56 \text{ l.mol}^{-1} & N_2 = 304,20 \end{array}$$

5) La demetilclortetraciclina se une a la seroalbúmina bovina alcanzando el mayor porcentaje de unión de 89,54% a la concentración de $2,36 \cdot 10^{-4} M$.

- 6) Los resultados de unión de la demetilclortetraciclina a la seroalbúmina bovina indican que al menos existen dos clases de sitios de unión, siendo los parámetros de unión encontrados:

$$\begin{array}{ll} K_1 = 4,2 \cdot 10^4 \text{ l.mol}^{-1} & N_1 = 0,59 \\ K_2 = 2,6 \cdot 10^3 \text{ l.mol}^{-1} & N_2 = 2,38 \end{array}$$

- 7) La minociclina se une a la seroalbúmina bovina alcanzando el mayor porcentaje de unión de 90,46% a la concentración de $2,40 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

- 8) Los resultados de unión de la minociclina a la seroalbúmina bovina indican que al menos existen dos clases de sitios de unión, siendo los parámetros de unión encontrados:

$$\begin{array}{ll} K_1 = 1,7 \cdot 10^4 \text{ l.mol}^{-1} & N_1 = 1,14 \\ K_2 = 14 \text{ l.mol}^{-1} & N_2 = 707 \end{array}$$

- 9) La oxitetraciclina se une a la seroalbúmina bovina alcanzando el mayor porcentaje de unión de 96,54% a la concentración de $2,39 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

- 10) Los resultados de unión de la oxitetraciclina a la seroalbúmina bovina indican que al menos existen dos clases de sitios de unión, siendo los parámetros de unión encontrados:

$$K_1 = 3,8 \cdot 10^5 \text{ l.mol}^{-1} \quad N_1 = 2,26$$

$$K_2 = 2,5 \cdot 10^3 \text{ l.mol}^{-1} \quad N_2 = 3,42.$$

11) La tetraciclina se une a la seroalbúmina bovina alcanzando el mayor porcentaje de unión de 90,72% a la concentración de $2,25 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

12) Los resultados de unión de la tetraciclina a la seroalbúmina bovina indican que al menos existen dos clases de sitios de unión, siendo los parámetros de unión encontrados:

$$\begin{array}{ll} K_1 = 2,4 \cdot 10^4 \text{ l.mol}^{-1} & N_1 = 0,87 \\ K_2 = 30 \text{ l.mol}^{-1} & N_2 = 323,23 \end{array}$$

13) La quinidina a las concentraciones de $1,38 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ y de $5,50 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ origina un desplazamiento sobre el porcentaje de unión de una serie de tetraciclinas a la seroalbúmina bovina.

14) La quinidina a las concentraciones de $1,38 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ y de $5,50 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ origina un desplazamiento sobre el porcentaje de unión de la clortetraciclina ($2,29 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) de 3,65 y 7,88 respectivamente.

15) La quinidina a las concentraciones de $1,38 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ y de $5,50 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ origina un desplazamiento sobre el porcentaje de unión de la demetilclortetraciclina ($2,36 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) de 12,64 y 16,13 respectivamente.

- 16) La quinidina a las concentraciones de $1,38 \cdot 10^{-5} \text{M}$ y de $5,5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ origina un desplazamiento sobre el porcentaje de unión de la minociclina ($2,40 \cdot 10^{-4} \text{M}$) de 1,92 y 0,33 respectivamente.
- 17) La quinidina a las concentraciones de $1,38 \cdot 10^{-5} \text{M}$ y de $5,50 \cdot 10^{-6} \text{M}$ origina un desplazamiento sobre el porcentaje de unión de la oxitetraciclina ($2,39 \cdot 10^{-4} \text{M}$) de 5,64 y 6,98 respectivamente.
- 18) La quinidina a las concentraciones de $1,38 \cdot 10^{-5} \text{M}$ y de $5,50 \cdot 10^{-6} \text{M}$ origina un desplazamiento sobre el porcentaje de unión de la tetraciclina ($2,47 \cdot 10^{-4} \text{M}$) de 2,07 y 3,64 respectivamente.
- 19) La quinidina a las concentraciones de $1,38 \cdot 10^{-5} \text{M}$ y de $5,50 \cdot 10^{-6} \text{M}$ origina desplazamientos ligeros sobre el porcentaje de unión de una serie de tetraciclinas a la seroalbúmina bovina. De todas las tetraciclinas estudiadas la quinidina afecta en mayor grado en este desplazamiento a la demetilclortetraciclina.
- 20) La serie de tetraciclinas estudiadas originan desplazamientos sobre el porcentaje de unión de la quinidina a la seroalbúmina bovina muy significativos.
- 21) La clórtetraciclina ($2,29 \cdot 10^{-4} \text{M}$) origina un desplazamiento

sobre el porcentaje de unión de la quinidina a las concentraciones de $1,38.10^{-5}M$ y $5,50.10^{-6}M$ de 16,24 y de 20,87 respectivamente.

22) La demetilclortetraciclina ($2,36.10^{-4}M$) origina un desplazamiento sobre el porcentaje de unión de la quinidina a las concentraciones de $1,38.10^{-5}M$ y $5,50.10^{-6}M$ de 13,37 y 21,50 respectivamente.

23) La minociclina ($2,40.10^{-4}M$) origina un desplazamiento sobre el porcentaje de unión de la quinidina a las concentraciones de $1,38.10^{-5}M$ y $5,50.10^{-6}M$ de 14,82 y de 19,68 respectivamente.

24) La oxitetraciclina ($2,39.10^{-4}M$) origina un desplazamiento sobre el porcentaje de unión de la quinidina a las concentraciones de $1,38.10^{-5}M$ y $5,50.10^{-6}M$ de 9,57 y de 11,50 respectivamente.

25) La tetraciclina ($2,47.10^{-4}M$) origina un desplazamiento sobre el porcentaje de unión de la quinidina a las concentraciones de $1,38.10^{-5}M$ y $5,50.10^{-6}M$ de 11,07 y de 11,00 respectivamente.

26) La serie de tetraciclinas estudiadas originan desplazamientos considerables sobre el porcentaje de unión de la quinidina a la seroalbúmina bovina. Estas tetraciclinas estu-

diadas afectan en mayor grado el porcentaje de unión de la quinidina a la concentración de $5,50 \cdot 10^{-6} \text{M}$. La clortetraciclina, la demetilclortetraciclina y la minociclina son las que mas afectan el porcentaje de unión de la quinidina alcanzando valores entre 19-20 en su desplazamiento.

27) El 1-propranolol se une a la seroalbúmina bovina alcanzando el mayor porcentaje de unión de 54,60% a la concentración de $0,06 \cdot 10^{-5} \text{M}$.

28) Los resultados de unión de 1-propranolol a la seroalbúmina bovina indican que al menos existen dos clases de sitios de unión, siendo los parámetros de unión encontrados:

$$\begin{array}{ll} K_1 = 2,2 \cdot 10^5 \text{ l.mol}^{-1} & N_1 = 0,0092 \\ K_2 = 5,6 \cdot 10^3 \text{ l.mol}^{-1} & N_2 = 0,26 \end{array}$$

29) El 1-propranolol a las concentraciones de $2,71 \cdot 10^{-5} \text{M}$; $0,67 \cdot 10^{-5} \text{M}$; $0,33 \cdot 10^{-5} \text{M}$; $0,20 \cdot 10^{-5} \text{M}$; y $0,06 \cdot 10^{-5} \text{M}$ origina un desplazamiento sobre el porcentaje de unión de una serie de tetraciclinas a la seroalbúmina bovina.

30) El 1-propranolol a las concentraciones de $2,71 \cdot 10^{-5} \text{M}$; $0,67 \cdot 10^{-5} \text{M}$; $0,33 \cdot 10^{-5} \text{M}$; $0,20 \cdot 10^{-5} \text{M}$; y $0,06 \cdot 10^{-5} \text{M}$ origina un desplazamiento sobre el porcentaje de unión de la clortetraciclina ($2,29 \cdot 10^{-4} \text{M}$) de 32,03 ; 19,66 ; 22,76 ; 25,07 y 25,07 respectivamente.

- 31) El 1-propranolol a las concentraciones de $2,71 \cdot 10^{-5} \text{M}$; $0,67 \cdot 10^{-5} \text{M}$; $0,33 \cdot 10^{-5} \text{M}$; $0,20 \cdot 10^{-5} \text{M}$ y $0,06 \cdot 10^{-5} \text{M}$ origina un desplazamiento sobre el porcentaje de unión de la demetilclortetraciclina ($2,36 \cdot 10^{-4} \text{M}$) de 13,40 ; 16,62 ; 27,54 ; 25,81 y 20,45 respectivamente.
- 32) El 1-propranolol a las concentraciones de $2,71 \cdot 10^{-5} \text{M}$; $0,67 \cdot 10^{-5} \text{M}$; $0,33 \cdot 10^{-5} \text{M}$; $0,20 \cdot 10^{-5} \text{M}$ y $0,06 \cdot 10^{-5} \text{M}$ origina un desplazamiento sobre el porcentaje de unión de la minociclina ($2,40 \cdot 10^{-4} \text{M}$) de 41,46 ; 37,10 ; 62,96 ; 40,78 y 45,69 respectivamente.
- 33) El 1-propranolol a las concentraciones de $2,71 \cdot 10^{-5} \text{M}$; $0,67 \cdot 10^{-5} \text{M}$; $0,33 \cdot 10^{-5} \text{M}$; $0,20 \cdot 10^{-5} \text{M}$ y $0,06 \cdot 10^{-5} \text{M}$ origina un desplazamiento sobre el porcentaje de unión de la oxitetraciclina ($2,39 \cdot 10^{-4} \text{M}$) de 26,54 ; 40,18 ; 39,49 ; 40,72 y 25,13 respectivamente.
- 34) El 1-propranolol a las concentraciones de $2,71 \cdot 10^{-5} \text{M}$; $0,33 \cdot 10^{-5} \text{M}$; $0,33 \cdot 10^{-5} \text{M}$; $0,20 \cdot 10^{-5} \text{M}$ y $0,06 \cdot 10^{-5} \text{M}$ origina un desplazamiento sobre el porcentaje de unión de la tetraciclina ($2,47 \cdot 10^{-4} \text{M}$) de 19,91 ; 19,68 ; 22,14 ; 23,36 y 13,36 respectivamente.
- 35) El 1-propranolol origina desplazamientos muy considerables sobre el porcentaje de unión de una serie de tetraciclinas a la seroalbúmina bovina. El mayor desplazamiento originado

por el 1-propranolol afecta a la minociclina, alcanzandose valores desde 37 a 63.

- 36) La serie de tetraciclinas estudiadas originan un desplazamiento ligero sobre el porcentaje de unión del 1-propranolol a la seroalbúmina bovina.
- 37) Los resultados de unión del 1-propranolol a la seroalbúmina bovina en presencia de la serie de tetraciclinas estudiadas indican que sigue existiendo al menos dos clases de puntos de unión.
- 38) Los parámetros de unión del 1-propranolol:

$$\begin{array}{ll} K_1 = 2,2 \cdot 10^5 \text{ l.mol}^{-1} & N_1 = 0,0092 \\ K_2 = 5,6 \cdot 10^3 \text{ l.mol}^{-1} & N_2 = 0,26 \end{array}$$

son alterados en presencia de clortetraciclina ($2,29 \cdot 10^{-4} \text{ M}$)

a:

$$\begin{array}{ll} K_1 = 1,8 \cdot 10^5 \text{ l.mol}^{-1} & N_1 = 0,01 \\ K_2 = 2,7 \cdot 10^4 \text{ l.mol}^{-1} & N_2 = 0,055 \end{array}$$

- 39) Los parámetros de unión del 1-propranolol

$$\begin{array}{ll} K_1 = 2,2 \cdot 10^5 \text{ l.mol}^{-1} & N_1 = 0,0092 \\ K_2 = 5,6 \cdot 10^3 \text{ l.mol}^{-1} & N_2 = 0,26 \end{array}$$

son alterados en presencia de la demetilclortetraciclina ($2,36 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) a:

$$\begin{array}{ll} K_1 = 1,4 \cdot 10^5 \text{ l.mol}^{-1} & N_1 = 0,0225 \end{array}$$

$$K_2 = 1,7 \cdot 10^4 \text{ l.mol}^{-1} \quad N_2 = 0,074$$

40) Los parámetros de unión del l-propranolol

$$K_1 = 2,2 \cdot 10^5 \text{ l.mol}^{-1} \quad N_1 = 0,0092$$

$$K_2 = 5,6 \cdot 10^3 \text{ l.mol}^{-1} \quad N_2 = 0,26$$

son alterados en presencia de la minociclina ($2,40 \cdot 10^{-4} \text{ M}$)

a:

$$K_1 = 1,4 \cdot 10^5 \text{ l.mol}^{-1} \quad N_1 = 0,011$$

$$K_2 = 2,1 \cdot 10^4 \text{ l.mol}^{-1} \quad N_2 = 0,06$$

41) Los parámetros de unión del l-propranolol

$$K_1 = 2,2 \cdot 10^5 \text{ l.mol}^{-1} \quad N_1 = 0,0092$$

$$K_2 = 5,6 \cdot 10^3 \text{ l.mol}^{-1} \quad N_2 = 0,26$$

son alterados en presencia de oxitetraciclina ($2,39 \cdot 10^{-4} \text{ M}$)

a:

$$K_1 = 1,4 \cdot 10^5 \text{ l.mol}^{-1} \quad N_1 = 0,011$$

$$K_2 = 1,4 \cdot 10^4 \text{ l.mol}^{-1} \quad N_2 = 0,087$$

42) Los parámetros de unión del l-propranolol

$$K_1 = 2,2 \cdot 10^5 \text{ l.mol}^{-1} \quad N_1 = 0,0092$$

$$K_2 = 5,6 \cdot 10^3 \text{ l.mol}^{-1} \quad N_2 = 0,26$$

son alterados en presencia de la tetraciclina ($2,47 \cdot 10^{-4} \text{ M}$)

a:

$$K_1 = 1,4 \cdot 10^5 \text{ l.mol}^{-1} \quad N_1 = 0,011$$

$$K_2 = 2,1 \cdot 10^4 \text{ l.mol}^{-1} \quad N_2 = 0,06$$

BIBLIOGRAFIA

6. Bibliografia

- 1) DINGELL, J.V., SULSER, F. and GILLETTE, J.R.: Species differences in the metabolism of imipramine and desmethylimipramine (DMI). *J.Pharmaco.Exp.Ther.* 143: 14-22, 1964.
- 2) ANTON, A.H.: The relationship between the binding of sulfonamides to albumin and their antibacterial efficacy. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 129: 282-290, 1960.
- 3) YESAIR, D.W., REMINGTON, L., CALLAHAN, M. and KENSLER, C.J.: Comparative effects of salicylic acid, phenylbutazone, probenecid and other anions on the metabolism, distribution and excretion of indometacin by rats. *Biochem. Pharmacol.* 19: 1591-1600, 1970.
- 4) SOLOMON, H.M., SCHROGIE, J.J. and WILLIAMS, D.: The displacement of phylbutazone ¹⁴C and warfarin ¹⁴C from human albumin by various drugs and fatty acids. *Biochem.Pharmacol.* 17: 143-151, 1968.
- 5) CHIGNELL, C.F., VESELL, E.S., STARKWEATHER, D.K. and BERLIN, C.M.: The binding of sulfaphenazole to fetal, neonatal and adult human plasma albumin. *Clin.Pharmacol.Ther.* 12: 897-901, 1971.
- 6) SCATCHARD, G., SCHEINBERG, I.H. and ARMSTRONG, S.H.: Physical chemistry of protein solutions. IV The combination of human serum albumin with chloride ion. *J.Amer.Chem.Soc.* 72: 535-540, 1950.
- 7) CARR, C.W.: Studies on the binding of small ions in protein solutions with the use of membrane electrodes. III. The binding of chloride ions in solution of various proteins. *Arch.Biochem.Biophys.* 46: 417-424, 1953.
- 8) SCATHARD, G., COLEMAN, J.S., and SHEN, A.L.: Physical chemistry of protein solutions. VII. The binding of some small anions to serum albumin. *J.Amer.Chem.Soc.* 79: 12-20, 1957.
- 9) STRICKS, W. and KOLTHOFF, I.M.: Polarographic determination of the molecular weight of serum albumin by its effect on the diffusion current of methyl orange. *J.Amer.Chem.Soc.* 71: 1519, 1949.
- 10) TAWFORD, C.: The effect of serum albumin on the polarographic diffusion current of cadmium. *J.Amer.Chem.Soc.* 73: 2066-2076, 1951.
- 11) STRAUSS, G. and STRAUSS, U.P.: The binding of sodium dodecyl sulfate by serum albumin in the absence of added electrolyte. *J.Phys.Chem.* 62: 1321-1324, 1958.
- 12) MCLEAN, F.C. and HASTINGS, A.B.: A biological method for the estimation of calcium ion concentration. *J.Biol.Chem.* 107: 337-350, 1934.

- 13) KLOTZ, I.M., TRIWUSH, H. and WALKER, F.M.: The binding of organic ions by proteins. Competition phenomena and denaturation effects. *J.Amer.Chem.Soc.* 70: 2935-2941, 1948.
- 14) SANTOS, E.C. and SPECTOR, A.A.: Effect of fatty acids on the binding of 1-anilino-8-naphthalenesulfonate to bovine serum albumin. *Biochemistry* 11: 2299-2302, 1972.
- 15) SMALLCOMBE, S.H., GAMMON, K.L. and RICHARDS, J.H.: Magnetic resonance studies of protein small molecule interactions. Binding of N-trifluoro-acetyl-D-(and L-)-tryptophan to alfa-chymotrypsin. *J.Amer.Chem.Soc.* 94: 4581-4584, 1972.
- 16) KLOTZ, I.M., WALKER, F.M. and PIVAN, R.B.: Binding of organic ions by proteins. *J.Amer.Chem.Soc.* 68: 1486-1490, 1946.
- 17) SPECTOR, R., VERNICK, R. and LORENZO, A.V.: Effects of pressure on the plasma binding of digoxin and ouabain in an ultrafiltration apparatus. *Biochem.Pharmacol.* 22: 2485-2487, 1973.
- 18) BOYER, P.D., BALLON, G.A. and LUCK, J.M.: The combination of fatty acids and related compounds with serum albumin. III. The nature and extent of the combination. *J.Biol.Chem.* 167: 407-424, 1947.
- 19) CHANUTIN, A., LUDEWIG, S. and MASKET, A.V.: Studies on the calcium protein relationship with the aid of the ultracentrifuge. I. Observations of calcium caseinate solutions. *J.Biol.Chem.* 143: 737, 1942.
- 20) STEINBERG, I.Z. and SCHACHMAN, H.K.: Ultracentrifugation studies with absorption optics. V. Analysis of interacting systems involving macromolecules and small molecules. *Biochemistry* 5 (12): 3728-3747, 1966.
- 21) KARUSH, F.: Heterogeneity of binding sites of bovine serum albumin. *J.Amer.Chem.Soc.* 72: 2705-2713, 1950.
- 22) WEIR, E.C. and HASTINGS, A.B.: The ionization constants of calcium proteinate determined by the solubility of calcium carbonate. *J.Biol.Chem.* 114: 397-406, 1936.
- 23) BISCHOFF, F. and PILHORN, H.R.: The state and distribution of steroid hormones in biologic systems. III. Solubilities of testosterone, progesterone, and alfa-estradiol in aqueous salt and protein solution and in serum. *J.Biol.Chem.* 174: 663-682, 1948.
- 24) SCHUBERT, J.: Ion exchange studies of complex ions as a function of temperature, ionic strength, and presence of formaldehyde. *J.Phys.Chem.* 56: 113-118, 1952.

- 25) WISHNIA, A.: The solubility of hydrocarbon gases in protein solutions. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* 48: 2200-2204, 1962.
- 26) HUMMEL, J.P. and DREYER, W.J.: Measurement of protein-binding phenomena by gel filtration. *Biochem.Biophys.Acta* 63: 530-532, 1962.
- 27) FAIRCLOUGH, G.F. and FRUTON, J.S.: Peptide-protein interactions as studied by gel filtration. *Biochemistry* 5: 673-683, 1966.
- 28) KLOTZ, I.M.: Spectrophotometric investigations of the interactions of proteins with organic anions. *J.Amer.Chem.Soc.* 68: 2299-2304, 1946.
- 29) COLEMAN, J.E.: Carbonic anhydrase-azosulfonamide complexes. *J.Biol.Chem.* 243: 4574-4587, 1968.
- 30) DANIEL, E. and WEBER, G.: Cooperative effects in binding by bovine serum albumin. I. The binding of 1-anilino-8-naphthalenesulfonate. Fluorometric titrations. *Biochemistry* 5 (6): 1893-1900, 1966.
- 31) EDELMAN, G.M. and MACCLURE, W.O.: Fluorescent probes and the conformation of proteins. *Acc.Chem.Res.* 1: 65-70, 1968.
- 32) HSIA, J.C. and PIETTE, L.H.: Spin-labeling as a general method in studying antibody active site. *Arch.Biochem.Biophys.* 129: 297-307, 1969.
- 33) OGATA, R.T. and MACCOMMELL, H.M.: Mechanism of cooperative oxygen binding to hemoglobin. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* 69: 335-339, 1972.
- 34) DAHLQUIST, F.W. and RAFTERY, M.A.: A nuclear magnetic resonance study of association equilibria and enzyme-bound environments of N-acetyl-D-glucosamine anomers and lysozyme. *Biochemistry* 7: 3269-3276, 1968.
- 35) JARDETSKY, O. and WADE, N.G.: On the mechanism of binding of sulfonamides to bovine serum albumin. *J.Mol.Pharmacol.* 1: 214-230, 1965.
- 36) SPOTSWOOD, T.M., EVANS, J.M. and RICHARDS, J.H.: Enzyme-substrate interaction by nuclear magnetic resonance. *J.Amer.Chem.Soc.* 89: 5052-5054, 1967.
- 37) HAUGLAND, R.P., STRYLER, L., STENGLE, T.R., BALDESCHWIELER, J.D.: Nuclear magnetic resonance studies of antibody-hapten interactions using a chloride ion Probe. *Biochemistry*, 6: 498-502, 1967.
- 38) SCATCHARD, G., BATCHELDER, A.C. and BROWN, A.: Preparation and properties of serum and plasma proteins. VI. Osmotic equilibria in solutions of serum albumin and sodium chlo-

- ride. J.Amer.Chem.Soc. 68: 2320-2329, 1946.
- 39) EDSALL, J.T., EDELHORH, H., LOUTIE, R. and MORRISON, P.R.: Light scattering in solutions of serum albumin: effects of charge and ionic strength. J.Amer.Chem.Soc. 72: 4641-4656, 1950.
- 40) SCATCHARD, G. and BLACK, E.S.: The effect of salts on the ionic and isoelectric points of proteins. J.Phys.Chem. 53: 88-99, 1949.
- 41) CASSEL, J. and STEINHARDT, J.: Limitations inherent in the ΔpH method of determining binding isotherms of bovine serum albumin. Biochemistry 8(6): 2603-2609, 1969.
- 42) HUGHES, W.L.Jr.: An albumin fraction isolated from human plasma as a crystalline mercuric salt. J.Amer.Chem.Soc. 69: 1836-1837, 1947.
- 43) KIRSCHNER, M.W. and SCHACHMAN, H.K.: Conformational changes in proteins as measured by difference sedimentation studies. II. Effect of stereospecific ligands on the catalytic subunit of aspartate transcarbamylase. Biochemistry 10(10): 1919-1925, 1971.
- 44) KERESZTES-NAGY, S. and KLOTZ, I.M.: Influence of coordinating ligands on structure and spectra of hemerythrin. Biochemistry 4(5): 919-931, 1965.
- 45) GARBETT, K., DARNALL, D.W. and KLOTZ, I.M.: The effects of bound anions on the reactivity of residues in hemerythrin. Arch.Biochem.Biophys. 142: 455-470, 1971.
- 46) HUESTIS, W.H. and RAFTERY, M.A.: Use of fluorine-19 nuclear magnetic resonance to study conformation changes in selectively modified reibunuclease S. Biochemistry 10: 1181-1186, 1971.
- 47) CRESPI, H.L., ROSEMBERG, R.M., KATZ, J.J.: Proton magnetic resonance of proteins fully deuterated except for 3H -leucine side chains. Science 161: 795-796, 1968.
- 48) BLAKE, C., JOHNSON, L.N., NORTH, A.C.T., PHILLIPS, D.C. and SARMA, V.R.: Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. Proc.Roy.Soc.Ser.B. 167: 378-388, 1967.
- 49) SCHOENBORN, B.P.: Binding of xenon to horse haemoglobin. Nature (London) 208: 760-762, 1965.
- 50) PAULING, L. and CORYELL, C.D.: The magnetic properties and structure of hemoglobin, oxyhemoglobin and carbonmonoxyhemoglobin. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 22: 210-216, 1936.
- 51) ALBERTY, R.A. and MARVIN, H.H.Jr.: Study of protein-ion inte-

reaction by the moving boundary method. The combination of bovine serum albumin with chloride ion. *J.Amer.Chem. Soc.* 73: 3220-3223, 1951.

- 52) BARLOW, G.H. and HARGOLIASH, E.: Electrophoretic behavior of mammalian-type cytochromes C. *J.Biol.Chem.* 241: 1473-1477, 1966.
- 53) LERNER, A.B., FITZPATRICK, T.B., CALKINS, E. and SUMMERSON, W.H.: Mamalian tyrosinase: the relationship of cooper to enzymatic activity. *J.Biol.Chem.* 187: 793-802, 1950.
- 54) BLATT, W.F., ROBINSON, S.M. and BIXLER, H.J.: Membrane ultrafiltration: the diafiltration technique and its application to microsolute exchange and binding phenomena. *Anal.Biochem.* 26: 151-173, 1968.
- 55) COLOWICK, S.P. and WOMACK : Binding of diffusible molecules by macromolecules: rapid measurement by rate of dialysis. *J.Biol.Chem.* 224(3): 774-777, 1969.
- 56) SPECTOR, R., KORKIN, D.T. and LORENZO, A.V.: A rapid method for the determination of salicylate binding by the use of ultrafilters. *J.Pharm.Pharmacol.* 24: 786-789, 1972.
- 57) BRODIE, B.B. and HOGGEN, C.A.M.: Some physico-chemical factors in drug action. *J.Pharmacol.* 9: 345, 1957.
- 58) GIBALDI, M. and SCHWARTZ, M.A.: Apparent effect of probenecid on the distribution of penicillins in man. *Clin.Pharmacol.Ther.* 9: 345, 1968.
- 59) YÜ, T.F., DAYTON, P.G. and GUTMAN, A.B.: Mutual suppression of the uricosuric effects of sulfinpyrazone and salicylate: a study of interactions of drugs. *J.Clin.Invest.* 42: 1330, 1963.
- 60) FRANZ, J.W., JÄHNCHEN, E. and KRIEGLSTEIN, J.: The influence of several drugs on the binding ability of an albumin solution for promazine and chlorpromazine. *Naunyn-Schmiedeberg Arch.Exp.Pathol.Pharmacol.* 264: 462, 1969.
- 61) MEYER, M. and GUTTMAN, D.E.: The binding of drugs by plasma proteins. *J.Pharm.Sci.* 57: 895, 1968.
- 62) RUDMAN, D., BIXLER, T.J. and del RIO, A.E.: Effect of free fatty acids on binding of drugs by bovine serum albumin, by human serum albumin and by rabbit serum. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 176: 261, 1971.
- 63) GREEN, H.O., ORITZ, J. and LACK, L.: Binding of sodium taurocholate by bovine serum albumin. *Biochem.Biophys.Acta* 231: 550, 1971.
- 64) KRIEGLSTEIN, J., MEILER, W. and STAAB, J.: Hydrophobic and ionic interactions of phenothiazine derivatives with

- bovine serum albumin. *Biochem.Pharmacol.* 21: 985, 197
- 65) VAN DER VLIES, C.: Binding of a diphenhydramine analogue to BSA. An NMR investigation. *Biochem.Pharmacol.* 19: 859, 1970.
- 66) GOLDSTEIN, A.: The interactions of drugs and plasma proteins. *Pharmacol.Rev.* 1: 102, 1949.
- 67) SETTLE, W., HEGEMAN, S. and FEATHRSTONE, R.W.: The nature of drug-protein interaction. In concepts in Biochemical Pharmacology. Part I., 1971.
- 68) GARTEN, S. and WOSILAIT, W.D.: Comparative study of the binding of coumarin anticoagulants and serum albumins. *Biochem.Pharmacol.* 20: 1661, 1971.
- 69) REIDEMBERG, M.M.: The binding of drugs to plasma proteins from patients with poor renal function. *Clin.Pharmacol* 1: 121-125, 1976.
- 70) BLASCHKE, T.F.: Protein binding and kinetics in liver disease *Clin.Pharmacol.* 2: 32-44, 1977.
- 71) GUGLER, R. and AZARNOFF, D.L.: Drug protein binding and the nephrotic syndrome. *Clin.Pharmacol.* 1: 25-35, 1976.
- 72) TILLEMENT, J.P., LHOSTE, F. and GUIUDICELLI, J.F.: Diseases and drug protein binding. *Clin.Pharmacol.* 3: 144-154, 1978.
- 73) KOCH-WESER, J.: Serum drug concentrations as therapeutics guides. *New Engl.J.Med.* 287: 227-231, 1972.
- 74) NEFF, C.A., DAVIS, L.E. and BAGOTT, J.D.: A comparative study of the pharmacokinetics of quinidine. *Am.J.Vet.Res.* 33 1521-1525, 1972.
- 75) KALMANSON, R.W., SAMPSON, J.J.: Studies of plasma quinidine content. I. Relation to single dose administration by three routes. *Circulation* 1: 564-568, 1950.
- 76) BELLET, S., ROMAN, L.R., BOZA, A.: Relations between serum quinidine levels and renal function: studies in normal subjects and patients with congestive failure and renal insufficiency. *Am.J.Cardiol.* 27: 368-371, 1971.
- 77) CONN, H.L., LUCHI, R.J.: Some cellular and metabolic considerations relating to the action of quinidine as a prototype antiarrhythmic agent. *Am.J.Med.* 37: 685-699, 1964.
- 78) PALMER, K.H., MARTIN, B., BAGGETT, B., WALL, M.E.: The metabolic fate of orally administered quinidine gluconate in humans. *Biochem.Pharmacol.* 18: 577-561, 1969.

- 79) SWISHER, W.P., WEDELL, H.G., CHENG, J.T.O., SUTTON, G.C., SUTTON, D.C.: Studies of quinidine plasma levels and rate of decline following cessation of quinidine administration. *Am.Heart J.* 47: 449-452, 1954.
- 80) KESSLER, K.M., LOWENTHAL, D.T., WARNER, H.: Quinidine elimination on patients with congestive heart failure or poor renal function. *N.Engl.Med.* 290: 706-709, 1974.
- 81) GUENTER, T.W., HOLFORD, N.H.G., COATES, P.E., UPTON, R.A. and RIEGELMAN, S.: Quinidine pharmacokinetics in man: Choice of a disposition model and absolute bioavailability studies. *J.Pharmacok.Biopharm.* 7(4): 315-330, 1979.
- 82) UEDA, C.T., WILLIAMSON, B.J. and DZINDZIO, B.S.: Absolute quinidine bioavailability. *Clin.Pharmacol.Ther.* 20: 260-265, 1976.
- 83) BYRNE-QUINN, E. and WING, A.J.: Maintenance of sinus rhythm after DC reversion of atrial fibrillation. *Br.Heart J.* 32: 370-376, 1970.
- 84) RESUEKOV, L., GIBSON, D., WAICH, S., MUIR, J. and MACDONALD, L.: Sustained-release quinidine (Kinidin Durules) in maintaining sinus rhythm after electroversion of atrial dysrhythmias. *Br.Heart J.* 33: 220-225, 1971.
- 85) CONN, H.L., LUCHI, R.J.: Some quantitative aspects of the binding of quinidine and related quinoline compounds by human serum albumin. *J.Clin.Invest.* 40: 509-516, 1961.
- 86) CONN, H.L.Jr. and LUCHI, R.J.: Ionic influences on quinidine-albumin interaction. *J.Pharmac.Exp.Ther.* 133: 76-83, 1961.
- 87) NILSEN, O.G. and JACOBSEN, S.: The binding of quinidine to protein fractions of normal human sera. *Biochem.Pharm.* 24: 995-998, 1975.
- 88) SHAND, D.G., MITCHELL, J.R. and OATES, J.A.: In Concepts in Biochemical Pharmacology. Part 3 (Eds. J.R. Gillette and J.R. Mitchell) pp. 272-314. Springer-Verlag, Berlin 1975.
- 89) GILLETTE, J.R.: In Concepts in Biochemical Pharmacology. Part 3. (Eds J.R. Gillette and J.R. Mitchell) pp. 35-85. Springer-Verlag, Berlin. 1975.
- 90) FREMSTAD, D., JACOBSEN, S. and LUNDE, P.K.M.: Influence of serum protein binding on the pharmacokinetics of quinidine in normal and anuric rats. *Acta Pharmac.Tox.* 41: 161-176. 1977.
- 91) GREENBLATT, D.J., PFEIFER, H.J., OCHS, H.R., FRANKE, K., MACLAUGHLIN, D.S., SMITH, T.W., and KOCH-WESER, J.: Pharmacokinetics of quinidine in humans after intravenous,

intramuscular and oral administration. J.Pharmac.exp. Ther. 202: 365-378. 1977.

- 92) NILSEN, O.G., FREMSTAD, D. and JACOBSEN, S.: Increased binding of quinidine to serum albumin and lipoproteins in anuric rats. Eur.J.Pharmac. 33: 131-139. 1975.
- 93) FREMSTAD, D. and JACOBSEN, S.: Binding of quinidine in serum and heart from normal and anuric rats, and the significance for distribution. Biochem.Pharmacology 28: 2611-2616. 1979.
- 94) FREMSTAD, D., BERGERUD, K., HAFFNER, J.F.W. and LUNDE, P.K.M.: Increased plasma binding of quinidine after surgery. A preliminary report. Eur.J.Clin.Pharmac. 10: 441-444. 1977.
- 95) NILSEN, O.G., LEREN, P., AAKESSON, I. and JACOBSEN, S.: Binding of quinidine in sera with different levels of triglycerides, cholesterol and orosomucoid protein. Biochem.Pharmacol. 27: 871-876. 1978.
- 96) CHIDSEY, C.A., MORSELLI, P., BIANCHETTI, G., MORGANTI, A., LEONETTI, G. and ZANCHETTI, A.: Studies of the absorption and removal of propranolol in hypertensive patients during therapy. Circulation 52: 313-318. 1975.
- 97) SHAND, D.G., NUCKOLLS, E.M., OATES, J.A.: Plasma propranolol levels in adults with observations in four children. Clin.Pharmacol. Ther. 11: 112-120. 1970.
- 98) PATERSON, J.W., CONOLLY, M.E., DOLLERY, C.T.: The pharmacodynamics and metabolism of propranolol in man. Pharmacol. Clin. 2: 127-133. 1970.
- 99) WALLE, T., GAFFNEY, T.E.: Propranolol metabolism in man and dog: mass spectrometric identification of six new metabolites. J.Pharmacol.Exp.Ther. 182: 83-93, 1972.
- 100) VALLE, T., ISHIZAKI, T., GAFFNEY, T.: Isopropylamine, a biologically active deamination product of propranolol in dogs: identification of denterated and unlabeled isopropylamine by gas chromatography-mass spectrometry. J. Pharmacol.Exp.Ther. 183: 508-512. 1972.
- 101) EVANS, G.H., NIES, A.S., SHAND, D.G.: The disposition of propranolol. III. Decreased half-life and volume of distribution as a result of plasma binding in man, monkey, dog and rat. J.Pharmacol.Exp.Ther. 186: 114-222. 1973.
- 102) HAYES, A., COOPER, R.G.: Studies on the absorption, distribution and excretion of propranolol in rat, dog and monkey. J.Pharmacol.Exp.Ther. 176: 302-311. 1971.
- 103) KEEN, P.: Effect of binding to plasma proteins on the distribution, activity and elimination of drugs. In Handbook of Experimental Pharmacology. vol. XXVIII/1. pp. 213-

233. Springer-Verlag, Berlin 1971.

- 104) BOND, P.A.: Metabolism of propranolol (Inderal), a potent, specific beta-adrenergic receptor blocking agent. *Nature* (London) 213: 721-723. 1967.
- 105) GWYN, H., EVANS, M.B. and SHAND, D.G.: Disposition of propranolol VI. Independent variation in steady-state circulating drug concentrations and half-life as a result of plasma drug binding in man. *Clin.Pharm.Ther.* 14(4): 494-500. 1973.
- 106) COLTART, D.J. and SHAND, D.G.: Plasma propranolol levels in the quantitative assessment of beta-adrenergic blockade in man. *Br.Med.J.* 3: 731-735. 1970.
- 107) GEORGE, C.F., FENYVESI, T. and DOLLERY, C.T.: Pharmacological effects of propranolol in relation to plasma level, in Davies D.S. and Prichard, B.N.C. editors: *Biological effects of drug in relation to their plasma concentrations*. Baltimore, University Park Press, pp. 123-133. 1973.
- 108) MACDEVITT, D.G., FRISK-HOLMBERG, M., HOLLIFIELD, J.W. and SHAND, D.G.: Plasma binding and the affinity of propranolol for a beta receptor in man. *Clin.Pharm.Ther.* 20(2) 152-157. 1976.
- 109) SAGER, G., NILSEN, O.G. and JACOBSEN, S.: Variable binding of propranolol in human serum. *Biochem.Pharm.* 28: 905-911 1979.
- 110) ARONSEN, K.F., EKELOUND, G., KINDMARK, C.O. and LAURELL, C.B.: Sequential changes of plasma proteins after surgical trauma. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 29: 127-136. 1972.
- 111) JOHANSON, B.G., KINDMARK, C.O., TRELL, E.Y. and WOLLHEIN, F.A.: Sequential changes of plasma proteins after myocardial infarction. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 29: 117-126. 1972.
- 112) WEISMAN, S., GOLDSMITH, B., WINZLER, R. and LEPPER, M.H.: Turnover of plasma orosomucoid in man. *J.Lab.Clin.Med.* 57: 1-7. 1961.
- 113) WARD, A.M., COOPER, E.H., TURNER, R., ANDERSON, J.A. and NEVILLE, A.M.: Acute-phase reactant protein profiles: aid to monitoring large bowel cancer by cea and serum enzymes. *Br.J.Cancer* 35: 170-175, 1977.
- 114) KUNIN, C.M., DORUBUSH, A.C. and FINLAND, M.: Distribution and excretion of four tetracycline analogues in normal young men. *J.Clin.Invest.* 38: 1950-1963. 1959.
- 115) KUNIN, C.M. and FINLAND, M.: Demethylchlortetracycline: a new tetracycline antibiotic that yields greater and more sustained antibacterial activity. *New Engl.J.Med.* 259: 999 1959.

- 116) SWEENEY, W.M., HARDY, S.M., DORUBUSH, A.C. and RUEGSEGGER, J.M.: Demethylchlortetracycline. A clinical comparison of a new antibiotic compound with chlortetracycline and tetracycline. *Antibiot. and Chemother.* 9: 13. 1959.
- 117) SPITZY, K.H. and HITZENBERGER, G.: The distribution volume of some antibiotics. *Antibiot. Ann.* 996: 1957-1958.
- 118) GROVE, D.C. and RANDALL, W.A.: Assay methods of antibiotics: A laboratory manual. New York, medical encyclopedia. Inc 50. 1950.
- 119) SIROTA, J.H. and SALTZMAN, A.: The renal clearance and plasma protein binding of aureomycin in man. *J.Pharmacol.Exp. Ther.* 100: 210-218. 1950.
- 120) MACDONALD, H., KELLY, R.G., ALLEN, E.S., NOBLE, J. KANEGIS, F.: Pharmacokinetics studies on minocycline in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* 14: 5, 852-861
- 121) KELLY, R.C. and KANEGIS, L.A.: Metabolism and tissue distribution of radioisotopically labeled minocycline. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 11: 171-183. 1967.
- 122) OKUBO, H., FUJIMOTO, Y., OKAMOTO, Y. and TSUKADA, J.: Laboratory and clinical experiments on minocycline. *Jap.J.Antibiot.* 22: 430-434. 1969.
- 123) WITTENAN, M.S.VON and YEARY, R.: The excretion and distribution in body fluids of tetracyclines after intravenous administration to dogs. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 140: 258-266. 1963.
- 124) KELLY, R.G. and KANEGIS, L.A.: Tissue distribution of tetracycline and chlortetracycline in the dog. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 11: 114-120. 1967.
- 125) KOHN, K.W.: Mediation of divalent metal ions in the binding of tetracycline to macromolecules. *Nature* 191: 1156-1158. 1961.
- 126) POPOV, P.G., VAPTZAROVA, K.I., KOSSEKOVA, G.P. and NIKOLOV, T.K.: Fluoremetric study of tetracycline-bovine serum albumin interaction. The tetracyclines -a new class of fluorescent probes. *Biochem.Pharmacol.* 21: 2363-2372. 1972.
- 127) ZIA, H. and PRICE, J.C.: Binding study of tetracyclines to human serum albumin using difference spectrophotometry. *J.Pharmaceutical Sci.* 65(2): 226-230. 1976.
- 128) KOHN, K.W., GASKINS, J., RALL, D.P.: The distribution of tetracyclines in the dog. *Fed.Proc.* 19: 141. 1960.
- 129) PINDELL, M.H., CULL, K.M., DORAM, K.M., DICKINSSON, H.L.: Absorption and excretion studies on tetracycline. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 125: 287-294. 1959.

- 130) WOZNIAK, L.A.: Studies on binding of tetracyclines by dog and human plasma. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 105: 430-433. 1960
- 131) ABRAHAM, E.P. and PHILL, M.A.: Chloranphenicol, aureomycin, terramycin and neomycin. *J.Pharm.Pharmac.* 3: 257-270. 1951.
- 132) POWIS, G.: A study of the interaction of tetracycline with human serum lipoproteins and albumin. *J.Pharm.Pharmac.* 26: 113-118. 1974.
- 133) SOLOMON, H.M. and SCHROGIE, J.J.: The effect of various drugs on the binding of warfarin ¹⁴C to human albumin. *Biochem. Pharmac.* 16: 1219-1226. 1967.
- 134) VESELL, E.S., PASSANANTI, G.T. and JOHNSON, A.O.: Failure of indomethacin and warfarin to interact in normal human volunteers. *J.Clin.Pharmac.* 15: 486-495. 1975.
- 135) KOCH-WESER, J.: The serum concentration of drugs. Ed. Merkus, F.W. *Excerpta Medica*. Amsterdam, Oxford, Princeton. pp. 3-13. 1980.
- 136) GILLETTE, J.F.: Overview of drug protein binding. *Annals of the New York Academy of Sci.* 226: 6-17. 1973.
- 137) MACQUEEN, E.G. and WARDELL, W.H.: Drug displacement from protein binding: isolation of a redistributional drug interaction in vivo. *Br.J.Pharm.* 43: 312-324. 1971.
- 138) WILLIAMS, R.L. and BENET, L.Z.: Drug pharmacokinetics in cardiac and hepatic disease. *Am.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 20: 389-413. 1980.
- 139) DAVISON, C.: Fundamentals of drug metabolism and drug disposition. Ed. by La Du, B.N., Mandel, H.G. and Way, E.L. p. 63 *Williams and Wilkins*, Baltimore. 1971.
- 140) FARESE, G., MAGER, M. and BLATT, W.: A membrane ultrafiltration procedure of determining diffusible calcium in serum. *Clin.Chem.* 16: 226-228. 1970.
- 141) REHBERG, P.B.: A centrifugation method of ultrafiltration using cellophane. *Acta Physiol.Scand.* 5: 305-310. 1943.
- 142) TORIBARA, T.Y., TEREPKA, A.R. and DAVEY, P.A.: The ultrafiltrable calcium of human serum. I. Ultrafiltration methods and normal values. *J.Clin.Invest.* 36: 738-748. 1957.
- 143) LOKEN, H.F., HAVEL, R.J., GORDAN, G.S. and WHITTIGTON, S.L.: Ultracentrifugal analysis of protein-bound and free calcium in human serum. *Biol.Chem.* 235: 3654-3658. 1960.
- 144) TERESI, J.D. and LUCK, J.M.: The combination of organic anions with serum albumin. *J.Biol.Chem.* 194: 823-834. 1952.

- 145) MACARTHUR, J.N. and SMITH, M.J.H.: The determination of the binding of salicylate to serum proteins. *J.Pharm.Pharmac.* 21: 589-594. 1969.
- 146) TATA, J.R., WIDNELL, C.C. and GRATZAE, W.B.: A systematic study of factors affecting the binding of thyroxine and related substances to serum. *Clin.Chem.Acta* 6: 597-612: 1961.
- 147) BICKEL, M.H. and BOVET, D.: Relationships between structure and albumin-binding of amines tested with crossing-paper electrophoresis. *J.Chromat.* 8: 466-474. 1962.
- 148) COOPER, M.H. and WOOD, G.C.: Protein-binding of small molecule a new gel filtration method. *J.Pharm.Pharmac.* 20: 150(S) 156(S). 1968.
- 149) CRAMER, G. and ISAKSSON, B.: Quantitative determination of quinidine in plasma. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 15: 553-556. 1963.
- 150) COLOWICK KAPLAN. *Methods in enzymology*. Academic Press Inc. New York. pp. 143. 1955.
- 151) ANTON, A.H.: A drug-induced change in the distribution and renal excretion of sulfonamides. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 134, 291-303, 1961.
- 152) SCHROGIE, J.J. and SOLOMON, H.M.: The anticoagulant response to bishydroxycoumarin. II. The effect of D-thyroxine, clofibrate and norethandrolone. *Clin.Pharm.Ther.* 8: 70-77, 1967.
- 153) DOLLERY, C.T, EMSLIE-SMITH, D. and MUGGLETON, D.F.: Action of chlorothiazide on the distribution, excretion and hypotensive effect of pempidine in man. *Br.J.Pharmac. Chemother.* 17: 488-506, 1961.
- 154) RUDMAN, D., MOLLINS, B., BIXLER, T.J. and MOSTELLER, R.C.: Transport of drugs, hormones and fatty acids in lipemic serum. *J.Pharmac.Exp.Ther.* 180: 797-810. 1972.
- 155) NILSEN, O.G. and JACOBSEN, S.: The influence of salts and differences in protein isolation procedure on the binding of quinidine to human serum albumin. *Biochem.Pharmac.* 25: 1261-1266, 1976.
- 156) FICHTL, B. and DOERING, W.: The digoxin-quinidine interaction: serum protein binding unlikely to be involved. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 11: 94-96. 1981.
- 157) DAHLQUIST, R., EJVINSSON, G. and SCHENCKGUSTAVSSON, K.: Effect of quinidine on plasma concentration and renal clearance of digoxin. A clinically important drug in-

teraction. Br.J.Clin.Pharmac. 9: 412-418. 1980.

- 158) DOERING, W.: Quinidine-digoxin interaction. Pharmacokinetics, underlying mechanism and clinical implications. New Engl.J.Med. 301: 400-404. 1979.
- 159) HAGER, W.D., FENSTER, P., MAYERSOHN, M., PERRIER, D., GRAVES, P., MARCUS, F.I. and GOLDMAN, S.: Digoxin-quinidine interaction. Pharmacokinetics evaluation. New Engl.J.Med. 300: 1238-1241. 1979.
- 160) EVANS, G.H. and SHAND, D.G.: Disposition of propranolol. VI. Independent variation in steady state circulating drug concentrations and half-life as a result of plasma drug binding in man. Clin.Pharmacol.Ther. 14: 494-500. 1973.
- 161) QUINN, E.L., COLVILLE, J.M., BALLARD, L., JONES, D. y DEBNAM, F.: Ampicillin: antimicrobial activity and pharmacological behaviour with reference to certain gram-positive cocci. Antimicrob. Agents Chemother. 190: 339-349. 1963.
- 162) ROLINSON, G.N., SUTHERLAND, R.: The binding of antibiotics to serum proteins. Br.J.Pharmacol. 25: 638-650. 1965.
- 163) KUNIN, C.M.: Therapeutic implications of serum protein binding of the new semi-synthetic penicillins. Antimicrob. Agents Chemother. 1965: 1025-1034. 1966.
- 164) BROWN, D.M.: Tissue distribution of penicillins. Postgrad. med.J. Suppl. 40: 31-36. 1964.
- 165) UNGAR, J.: Penicillin in tissue exudates after injection. Lancet 1: 56-59. 1950.
- 166) HIRSCH, H.A. and FINLAND, M.: Antibacterial activity of serum of normal subjects after oral doses of demethylchlortetracycline, chlortetracycline and oxytetracycline. New Engl.J.Med. 260: 1099. 1959.
- 167) EISENBERG, G.M., FOLTZ, E.L., PALAZOLLO, A.J. and FLIPPIN, H.F.: Laboratory and clinical observations on tetracycline. Antibiot. Ann. p. 611, 1954-1955.
- 168) BOHONOS, N., DORUBUSH, A.C., FELDMAN, L.L., MARTIN, J.M. PELCAK, E. and WILLIAMS, J.H.: In vitro studies with chlortetracycline, oxytetracycline and tetracycline. Antibiot. Ann. p. 49 1953-1954.
- 169) GARCIA DE JALON, P.D.: Farmacologia clínica secuencial en sus aspectos: cinético, farmacodinámico y terapéutico. Discurso de Ingreso en la Real Academia de Farmacia. Editorial Garsi. Madrid, 1981.

- 170) GARCIA DE JALON, P.D.: Problemas farmacocinéticos actuales.
Comun. a la R.Acad.Nac.Medicina. Ann. de la R.Acad.Nac.
Medicina. Tomo XCV, 451-473, 1978.

